

年 月 日

修正

I275645

申請日期：90.2.7

案號：90102663

公告本

類別：C12N15/53. 9/04. 1/15. 1/19. 1/21. 5/00. C12P 7/22. 13/00. 4/00

(以上各欄由本局填註)

# 發明專利說明書

修正  
92年3月20日  
補充

|            |                    |                                                                                                                                                 |
|------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 一、<br>發明名稱 | 中文                 | (R)-2-辛醇脫氫酵素，該酵素之製造方法，編碼該酵素之DNA及利用此DNA之醇類的製造方法                                                                                                  |
|            | 英文                 | (R)-2-OCTANOL DEHYDROGENASES, METHODS FOR PRODUCING THE ENZYMES, DNA ENCODING THE ENZYMES, AND METHODS FOR PRODUCING ALCOHOLS USING THE ENZYMES |
| 二、<br>發明人  | 姓名<br>(中文)         | 1. 工藤真丈<br>2. 山本浩明                                                                                                                              |
|            | 姓名<br>(英文)         | 1.<br>2.                                                                                                                                        |
|            | 國籍                 | 1. 日本 2. 日本                                                                                                                                     |
|            | 住、居所               | 1. 日本國茨城縣筑波市花畑2-13-12-401<br>2. 日本國茨城縣筑波市千現1-14-14-103                                                                                          |
| 三、<br>申請人  | 姓名<br>(名稱)<br>(中文) | 1. 大賽璐化學工業股份有限公司                                                                                                                                |
|            | 姓名<br>(名稱)<br>(英文) | 1.                                                                                                                                              |
|            | 國籍                 | 1. 日本                                                                                                                                           |
|            | 住、居所<br>(事務所)      | 1. 日本國大阪府堺市鐵砲町1番地                                                                                                                               |
|            | 代表人<br>姓名<br>(中文)  | 1. 小川大介                                                                                                                                         |
|            | 代表人<br>姓名<br>(英文)  | 1.                                                                                                                                              |



本案已向

| 國(地區)申請專利 | 申請日期       | 案號          | 主張優先權 |
|-----------|------------|-------------|-------|
| 日本 JP     | 2000/02/16 | 2000-43506  | 有     |
| 日本 JP     | 2000/12/08 | 2000-374593 | 有     |

有關微生物已寄存於

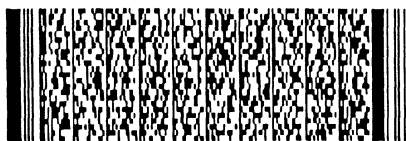
寄存日期

寄存號碼

食品工業發展研究所

2001/02/02

CCRC 940338



## 五、發明說明 (1)

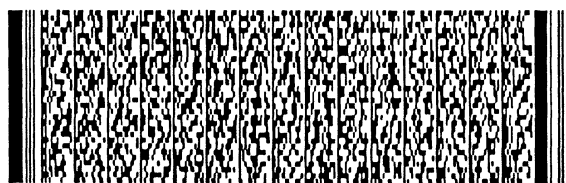
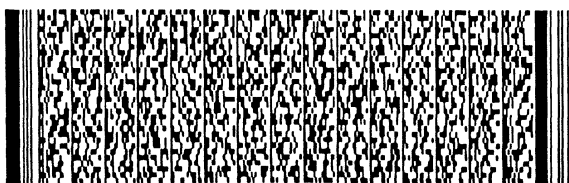
## 技術範圍

本發明是有關於對醇類、酮類，特別是(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯、(R)-丙氧基苯衍生物為始的光學活性醇類的製造有用之新式(R)-2-辛烷脫氫酵素，編碼該酵素之DNA，該酵素的製造方法，及採用該酵素製造以醇類、酮類，特別是(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯或(R)-丙氧基苯衍生物為始的光學活性醇的方法。

## 背景技術

(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯是利用作為H毫克-CoA還原酶及D-肉毒鹼(D-carnitine)等之合成中間產物的化合物。這種化合物在醫藥及農藥的合成上也有用。特別是光學上純粹的(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯的對掌體該如何取得(合成或分割)，成為產業上重要的課題。一直以來，已知的(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯製造方法有採用不齊合成、晶析、麵包酵母等微生物的不齊還原法(特開昭61-146191、特開平6-209782等)。然而已知的製造方法中，會有生成物光學純度低、回收率差等問題，而在工業利用上有困難。

此外，還有研究4-鹵化乙醯乙酸酯以(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯還原酵素還原的方法。例如已知的報告指出，以下述所示的酵素進行(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯的合成方法。然而，這些酵素是利用作為輔酶的還原型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(以NADPH稱之)的還原酶。依據於此，用這些酵素進行(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯的合



## 五、發明說明 (2)

成時，需要添加高價且化學性不安定的NADPH及進行再生，在工業上較不利。

- 麵包酵素由來的許多種還原酶(D-enzyme-1, D-enzyme-2, J. Am. Chem. Soc. 107, 2993-2994, 1985)

- 孢霉菌(Sporoporum)由來的醛還原酶2(Appl. Environ. Microbiol. 65, 5207-5211, 1999)

- 念珠菌(Candida macedoniensis)由來的酮基泛酸酯(ketopanthothenic ester)還原酶(Arch. Biochem. Biophys. 294, 469-474, 1992)

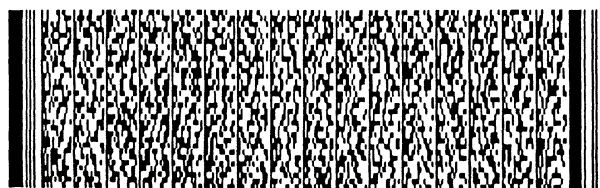
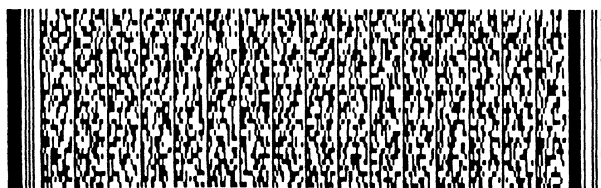
- 白色土毛菌(Geotrichum candidum)由來的4-氯化乙醯乙酸乙酯還原酶(Geotrichum candidum: Enzyme Microb. Technol. 14, 731-738, 1992)

- 念珠菌(Candida magnoliae)由來的羧基還原酶(WO 9835025)

- 柯魯弗氏黴菌(Kluyveromyces lactis)由來的羧基還原酶(特開平11-187869)

- 一種II型脂肪酸合成酵素作為 $\beta$ -酮基醯基-醯基攜帶蛋白還原酶(特開平2000-189170)

作為輔酶者，有還原型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(以NADH稱之)，與作為電子供給體進行還原反應的酵素者，已知有3 $\alpha$ -氫氧基類固醇脫氫酵素特開平1-277494)、甘油脫氫酵素(Tetrahedron Lett. 29, 2453-2454, 1988)、假單胞菌(Pseudomonas) PED由來的醇脫氫酵素



## 五、發明說明 (3)

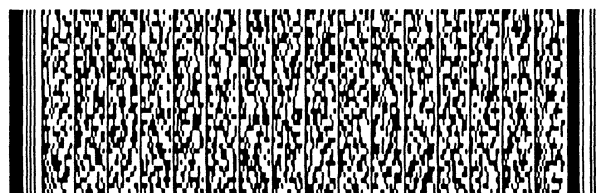
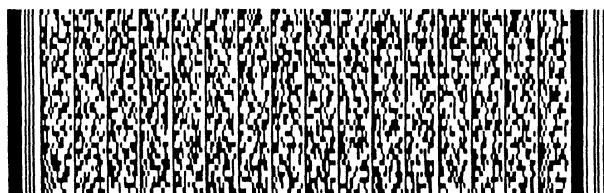
(Pseudomonas sp. PED, J. Org. Chem. 57, 1526-1532, 1992) 等，由於(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯合成反應的活性本身很低，在工業應用上較不利。

如以上所述，利用微生物及酵素之已知的(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯之製造方法，在光學純度、回收率、或是酵素活性等等各方面都有不足之處。這些問題也使得已知的製造方法在工業上難以應用。

一方面，(R)-丙氧基苯衍生物（特開平02-732）作為醫藥品、特別是合成抗菌劑的歐福洛沙素(Ofloxacin)光學活性體（(S)-(-)-9-氟-3-乙基-10-(4-乙基-1-哌嗪)-7-羰基-2, 3-二氫基-7H-吡啶[1, 2, 3-de][1, 4]苯並噁嗪-6-羧酸，特開平62-252790）等的合成中間產物是有用的化合物。如何取得此化合物在光學上的純粹對掌體（合成或是分割）是產業上重要的課題。

作為(R)-丙氧基苯衍生物的製造方法中，已知有將外消旋體丙氧基苯衍生物利用脂肪酶、酯酶進行不齊醯基化而合成的方法（特開平03-183489）。然而已知的方法在(R)體被不齊醯基化後，殘存的原料與醯基化的生成物在進行分離的工程時，醯基化的生成物必須經過脫醯基化工程，其工程複雜而不適於工業上生產之用。

此外，也有報告採用微生物進行丙酮基氧基苯衍生物之不齊還原的方法。然而已知的方法中，生成的(R)-丙氧基苯衍生物的光學純度為84-98%（特開平03-183489）、或是8.8-88.4%（特開平05-68577）之低，其基質濃度也



## 五、發明說明 (4)

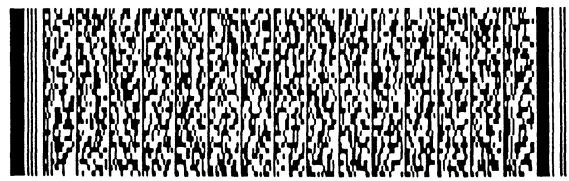
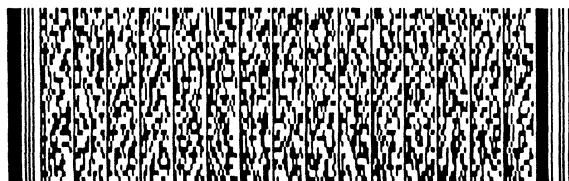
只有0.1-0.5%的程度，不適於工業上生產之用。作為高光學純度的不齊還原方法，在利用念珠菌(Candida magnoliae)生產的羰基還原酶方法（特開2000-175693）中，有報告指出可以達到合成出99%以上之光學純度的(R)-丙氧基苯衍生物。然而，本羰基還原酶是需要利用作為輔酶的NADPH的還原酶。依據於此，採用本酵素進行(R)-丙氧基苯衍生物合成時，會有添加高價且化學不安定之NADPH及進行再生的必要性，而不利於工業上使用。

## 發明概說

本發明的標的是提供利用NADH作為輔酶，進行4-鹵化乙醯乙酸酯之還原，生成高光學純度的(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯而具有酵素活性的新式酵素。還有，本發明的標的是提供利用該酵素製造高光學純度(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯的方法。

此外，本發明的標的是提供利用NADH作為輔酶，具有合成極高光學純度之作為合成抗菌劑之合成中間產物有用的(R)-丙氧基苯衍生物之酵素活性的新式酵素。還有，本發明的標的是利用該酵素製造高光學純度之(R)-丙氧基苯衍生物的方法。

本發明研究者認為利用作為電子供給體的NADH輔助脫氫酵素，在工業利用上將很有用。NADH比NADPH便宜，且化學上又較安定。此外，因為表現在作為生成光學活性(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯之酵素時也很有效率，與(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯的立體配置相同，且有與4-鹵化



## 五、發明說明 (5)

醯基乙酸酯非常相近的長鏈醇之(R)-2-辛烷是有高活性的醇脫氫酵素篩選的結果。

根據以前已知的報告指出，使(R)-2-辛醇立體選擇性氧化，具有生成2-辛醇之活性的二級醇脫氫酵素有可瑪單胞菌(*Comamonas terrigena*)、比齊酵母菌NRRL-Y-11328、假單胞菌SPD6由來的酵素。然而，還沒有關於這些酵素將4-鹵化乙醯乙酸酯還原，而生成(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯的報告。此外，這些酵素對(R)-2-辛醇的活性與2-丙醇之類側鏈短的2級醇比較之下，明顯的不具有高活性，因此推測在使結合羰基處較高側鏈之4-鹵化乙醯乙酸酯還原時，(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯生成活性會較低。

此處，本發明者對具有使(R)-2-辛醇優先氧化能力之酵素的微生物進行廣泛的篩選。其結果發現，屬於以下各屬的微生物具有使(R)-2-辛醇優先氧化能力的酵素。

比齊酵母菌(*Pichia*)屬

念珠菌(*Candida*)屬

歐加鐵(*Ogataea*)屬

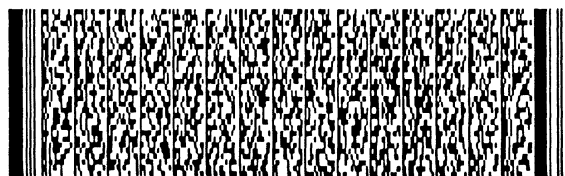
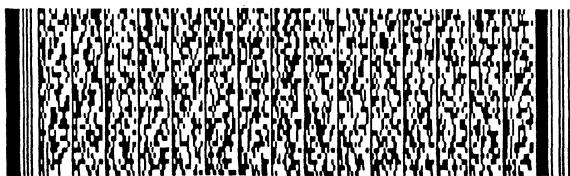
更具體的說，例如以下所述的微生物，發現是具有使(R)-2-辛醇優先氧化能力的酵素。

比齊酵母菌(*Pichia finlandica*)

比齊酵母菌(*Pichia jadinii*)

念珠菌(*Candida utilis*)

歐加鐵菌(*Ogataea wickerhamii*)



## 五、發明說明 (6)

更進一步，培養這些微生物，精製這些菌體中使(R)-2-辛醇氧化能力的酵素。接著，探討其性質之結果，發現該酵素具有對(R)-2-辛醇高立體選擇性的氧化能力，而且亦發現對於(R)-2-辛醇以外的多種2級醇也具有立體選擇性的氧化能力。此外，發現該酵素對4-氯化乙醯乙酸酯有高還原活性，不但會生成(S)-4-氯-3-氫氧基酪酸酯，同時發現該酵素也對2-丙酮基氧基-3, 4-二氯硝基苯有高還原活性，亦會生成2, 3-二氯-6-硝基-[[ (R)-2 氫氧基丙基] 氧基] 苯，而完成本發明。

也就是說本發明是有關於以下的醇類、酮類、特別是(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯為始的光學活性醇之製造有用的新式(R)-2-辛醇脫氫酵素，該酵素的編碼DNA，該酵素的製造方法，採用該酵素進行以醇類、酮類、特別是(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯衍生物為始之光學活性醇的製造方法。

[1] 一種(R)-2-辛醇脫氫酵素，具有以下所示的物理化學性質(1)及(2)。

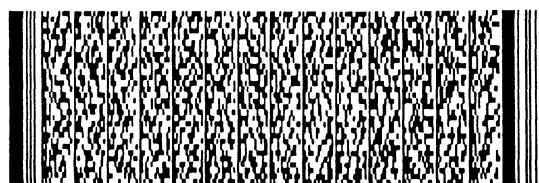
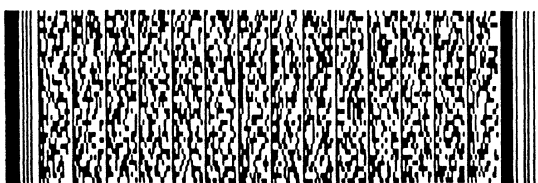
## (1) 作用

i) 以氧化型  $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸作為輔酶，將醇類氧化生成酮類。

ii) 以還原型  $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸作為輔酶，將酮類還原生成醇類。

## (2) 基質特異性

i) 使含有2-辛醇之兩個光學異構體中的(R)-2-辛醇



## 五、發明說明 (7)

優先氧化。

ii) 使4- 鹵化乙醯乙酸酯還原而生成(S)-4- 鹵化-3- 氫氧基酪酸酯。

[2] 如[1] 所記載的(R) -2- 辛醇脫氫酵素，更進一步具有以下所示的物理化學性質(3) 及(4)。

(3) 最適pH

氧化反應的最適pH 為8.0~11.0。還原反應的最適pH 為5.0~6.5。

(4) 基質特異性

i) 對於2級醇而言，具有比1級醇還高的酵素活性。

ii) 對於(R) -2- 辛醇而言，具有比2- 丙醇明顯較高的酵素活性。

[3] 不論是[1] 或者是[2] 所記載的(R) -2- 辛醇脫氫酵素，其由來為比齊酵母菌屬、念珠菌屬及歐加鐵屬中選擇出之任何種微生物。

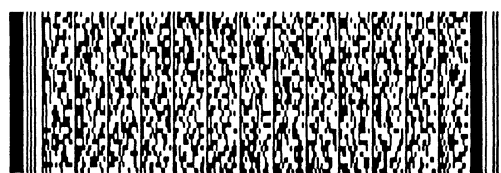
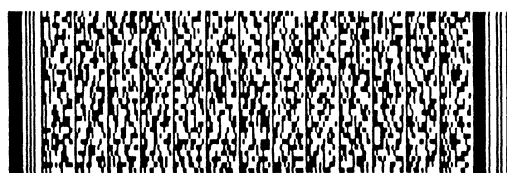
[4] 如[3] 所記載的(R) -2- 辛醇脫氫酵素，屬於比齊酵母菌屬者有Pichia finlandica。

[5] 如[3] 所記載的(R) -2- 辛醇脫氫酵素，屬於比齊酵母菌屬者有Pichia jadinii。

[6] 如[3] 所記載的(R) -2- 辛醇脫氫酵素，屬於念珠菌屬者有Candida utilis。

[7] 如[3] 所記載的(R) -2- 辛醇脫氫酵素，屬於歐加鐵屬者有Ogataea wickerhamii。

[8] 一種[1] 還有[2] 所記載的(R)-2- 辛醇脫氫酵素的



## 五、發明說明 (8)

製造方法，為含有其由來為比齊酵母菌屬、念珠菌屬及歐加鐵屬中選擇出之任何種微生物，由培養這些微生物產生[1]或者是[2]所記載的酵素的工程。

[9]一種編碼多核苷酸，具有下述(a)至(e)任何一項記載的(R)-2-辛醇脫氫酵素活性的蛋白質之編碼。

(a)序列編號：含有1所記載的鹽基序列的多核苷酸、

(b)序列編號：含有依照2所記載胺基酸序列之蛋白質編碼的多核苷酸、

(c)序列編號：含有2所記載的胺基酸序列中，一個或者是多個胺基酸被置換、缺失、插入及/或附加的胺基酸之蛋白質編碼的多核苷酸、

(d)序列編號：含有1所記載的鹽基序列的多核苷酸及在嚴苛條件下雜交的多核苷酸、

(e)序列編號：含有依照2所記載的胺基酸序列及具有70%以上相同的胺基酸序列編碼的多核苷酸、

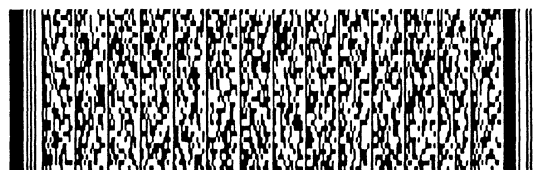
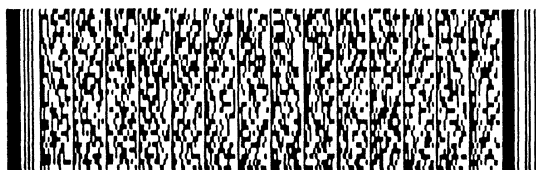
[10]一種依照如[9]所記載之多核苷酸編碼的蛋白質。

[11]一種插入如[9]所記載之多核苷酸的重組載體。

[12]如[11]所記載之重組載體，插入了更進一步以 $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸作為輔酶，而具有作為進行氧化還原反應觸媒的脫氫酵素能力的編碼多核苷酸。

[13]一種轉形體，表現可能保有如[9]所記載的多核苷酸，或[11]所記載的載體。

[14]如[10]所記載的一種蛋白質製造方法，含有培養



## 五、發明說明 (9)

如[13]所記載之轉形體的工程。

[15]一種醇類的製造方法，其特徵為如[1]還有[2]所記載的(R)-2-辛醇脫氫酵素，如[10]所記載的蛋白質，產生該酵素及蛋白質的微生物，或者是該微生物的處理物，作用於酮類，使該酮類還原而製造出醇類。

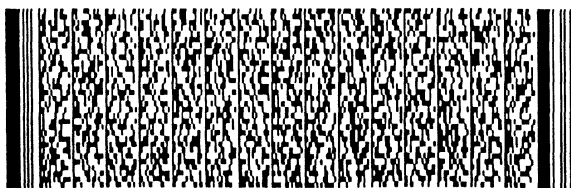
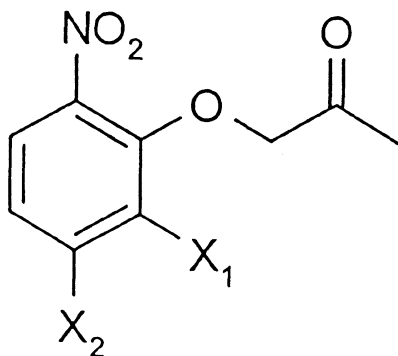
[16]如[15]所記載的醇類製造方法，具有前述微生物為如[13]所記載的轉形體。

[17]如[15]所記載的醇類製造方法，其酮類為4-鹵化乙醯乙酸酯衍生物，而其醇類為(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯衍生物。

[18]如[17]所記載的醇類製造方法，其4-鹵化乙醯乙酸酯衍生物為4-氯化乙醯乙酸乙酯，其醇類為(S)-4-氯-3-氫氧基酪酸乙酯。

[19]如[15]所記載的醇類製造方法，其酮類為如一般式1所示之丙酮基氧基苯衍生物

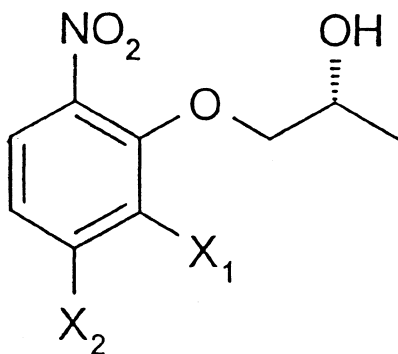
一般式1



## 五、發明說明 (10)

(式中，X<sub>1</sub>及X<sub>2</sub>分別代表鹵素原子之意)，其醇類為如一般式2所示之(R)-丙氧基苯衍生物。

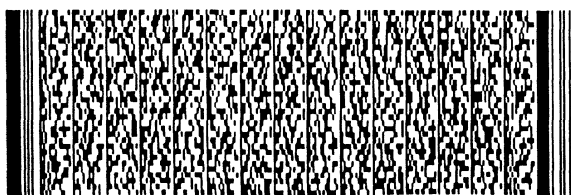
一般式2



[20] 如[19]所記載的醇類製造方法，前述丙酮基氧基苯衍生物為2-丙酮基氧基-3,4-二氟硝基苯，其醇類為2,3-二氟-6-硝基[[ (R)-2-氫氧基丙基]氧基]苯。

[21] 如[15]所記載的醇類製造方法，其特徵為含有更進一步附加氧化型β-菸鹼鹽胺腺嘌呤二核苷酸進行還原型的變換工程。

[22] 一種酮類製造方法，其特徵為[1]還有[2]所記載的(R)-2-辛醇脫氫酵素，及[9]所記載的蛋白質，產生該酵素及該蛋白質的微生物，或者是該微生物的處理物，對



## 五、發明說明 (11)

醇類作用，使該醇類氧化而製造酮類。

[23] 一種光學活性醇之製造方法，其特徵為[1]還有[2]所記載的(R)-2-辛醇脫氫酵素，及[9]所記載的蛋白質，產生該酵素及該蛋白質的微生物，或者是該微生物的處理物，對消旋體醇類作用，光學異性體會優先被氧化，而取得殘存的光學活性醇類。

[24] 如[22]及[23]所記載的方法，其特徵為含有更進一步附加還原型 $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸進行氧化型的變換工程。

本發明是提供含有以下(1)及(2)所示物理化學性質的酵素。

## (1) 作用

i) 以氧化型 $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸( $\text{NAD}^+$ )作為輔酶，將醇類氧化，生成酮類。

ii) 以還原型 $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸( $\text{NADH}$ )作為輔酶，將酮類還原，生成醇類。

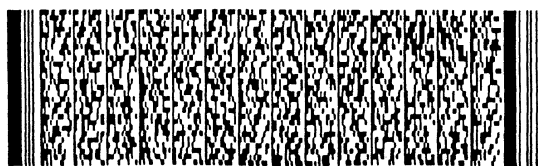
## (2) 基質特異性

i) 含有2-辛醇的2個光學異性體時，會優先對(R)-2-辛醇進行氧化。

ii) 還原4-鹵化乙醯乙酸酯而生成(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯。

而且，本發明的酵素希望更進一步具備以下酵素學性質(3)及(4)。

## (3) 至適pH



## 五、發明說明 (12)

(R)-2-辛醇氧化反應的最適pH為8.0~11.0。4-氯化乙醯乙酸乙酯還原反應的最適pH為5.0~6.5。

## (4) 基質特異性

i) 對於2級醇而言，具有比1級醇高的活性。

ii) 對(R)-2-辛醇而言，具有比2-丙醇明顯高的活性。

而且本發明所期待的(R)-2-辛醇脫氫酵素是具有以下所述的物理化學性質，及酵素學性質(5)至(8)。

## (5) 作用適溫的範圍

(R)-2-辛醇氧化反應的最適溫度為45-55℃。4-氯化乙醯乙酸乙酯還原反應的最適溫度為55-60℃。

## (6) 安定pH的範圍

pH8至9的範圍都很安定。

## (7) 阻斷

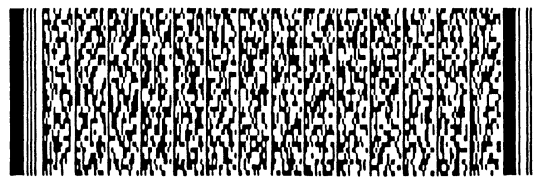
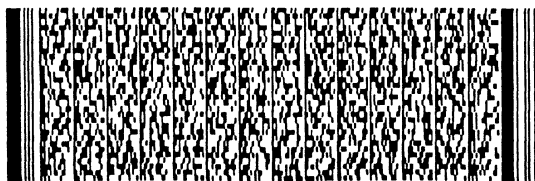
稍微會被有氯化汞及螯合劑的乙二胺四乙酸二鈉鹽(EDTA·2Na)阻斷。

## (8) 安定化

在N-乙基順丁烯二醯亞胺、鄰-菲繞啉(o-phenanthroline)、氯化鎂、氯化鈣、氯化錳下安定。

## (9) 精製方法

本發明的酵素是由產生該酵素的微生物依照通常使用的蛋白質精製方法，而可以精製得到的。例如，菌體被破碎後，進行魚精蛋白(proto 分鐘e)硫酸沈澱，將之離心分離取得上清，採用硫酸銨進行鹽析，更進一步用陰離子交



## 五、發明說明 (13)

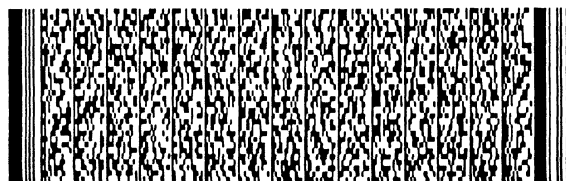
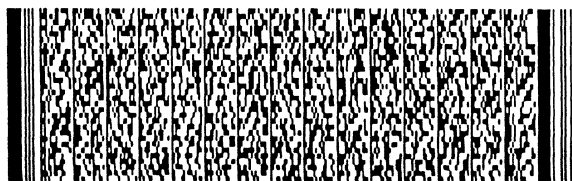
換色層分析法、疏水色層分析法、親和力色層分析法、通過膠體等方法組合，而精製得到。

本發明中「脫氫酵素」的意思是作為脫氫反應，也就是由含氫化合物除去氫之氧化反應觸媒的酵素。還有該酵素對於酮類有還原活性，在還原條件下，也有作為氧化反應逆反應觸媒的能力。依據於此，本發明中的「脫氫酵素」就是具有前述氧化反應逆反應的附加氫之還原反應觸媒的作用。一般以「脫氫酶」、「氧化還原酵素」、「氧化酶」還有「還原酶」等名稱稱呼的酵素在具有同樣作用的情形時，以本發明的「脫氫酵素」包含之。

本發明中，對於4-氯化乙醯乙酸酯的還原活性是以下述方法測定。於含有磷酸鉀緩衝液(pH 6.5)-100 mM、NADH-0.2 mM、4-氯化乙醯乙酸乙酯-20 mM及酵素的反應液，在30℃下反應，當NADH減少的同時，測定340 nm吸光度的減少，而能確認其活性。1單位代表1分鐘內使1  $\mu\text{mol}$  之NADH減少之觸媒的酵素量。此外，蛋白質的定量是採用Biorad製蛋白質試驗套組的色素結合法進行。

另一方面，(R)-2-辛醇氧化活性是以下述方法測定。也就是於含有Tris-鹽酸緩衝液(pH 8.5-50mM)緩衝液、NAD<sup>+</sup> 2.5 mM、(R)-2-辛醇5 mM及酵素的反應液，在30℃下反應，測定NADH生成造成之340 nm吸光度的增大，而能確認其活性。1單位代表1分鐘內使1  $\mu\text{mol}$  之NADH生成之觸媒的酵素量。

本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素對於(R)-2-辛醇具有高



## 五、發明說明 (14)

氧化活性。此外，該酵素之(R)-2-辛醇氧化活性是與2-丙醇氧化活性相較之下，明顯的具有較高的氧化活性。本發明中作為基質的(R)-2-辛醇在NAD<sup>+</sup>存在下接觸，NADH的增減不同時340 nm吸光度的單位時間相當於1單位2-丙醇相對活性2倍以上的變化率，更佳狀況是5倍以上時，脫氫酵素活性可稱之為明顯的較高。

此外，本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素使(R)-2-辛醇「優先」氧化是指(R)-2-辛醇脫氫酵素對2-辛醇R體的酵素活性當作100時，對S體的酵素活性只有50以下，較佳的狀況是20以下時，更佳為10以下時，稱之為優先氧化。

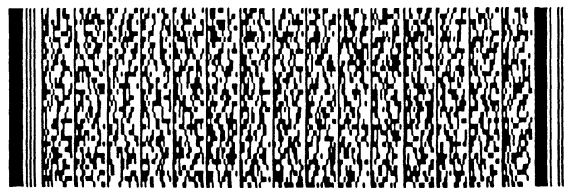
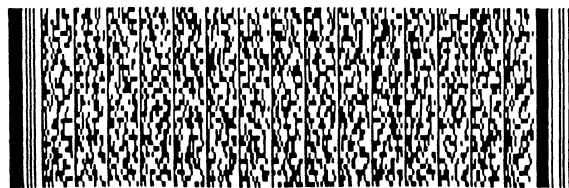
具有如上述之物理化學性質的(R)-2-辛醇脫氫酵素是由產生此酵素的微生物培養物取得的。例如比齊酵母菌屬、念珠菌屬及歐加鐵屬酵母，發現是可以產生本發明酵素的菌株。本發明發現比齊酵母菌屬的酵母Pichia finlandica、Pichia jadinii，念珠菌屬的酵母Candida utilis，歐加鐵屬的酵母歐加鐵菌Ogataea wickerhamii特別具有優良的(R)-2-辛醇脫氫酵素產生能力。為了得到本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素所利用的菌株舉例列示於下。

(i)Pichia finlandica: DSM 70280, DSM 1380

(ii)Pichia jadinii: DSM 2361, DSM 70167, IFO 0987

(iii)Candida utilis: IFO 0988, IFO 0626

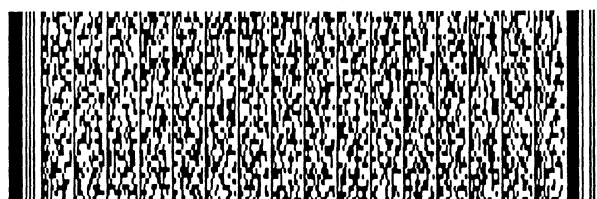
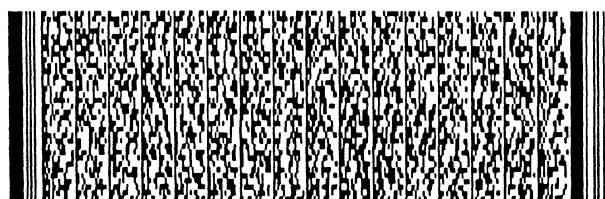
(iv)Ogataea wickerhamii: IFO 1706



## 五、發明說明 (15)

而且，關於Pichia finlandica生產的2級醇脫氫酵素，報告指出採用無細胞抽出液顯示仍具有2-丙醇脫氫酵素活性(Biochimica et Biophysica Acta, 716, 298-307, 1982)。然而本發明研究者追蹤試驗的結果顯示此菌株的無細胞抽出液含有多種2-丙醇脫氫酵素。另一方面，本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素只具有非常微弱的2-丙醇脫氫酵素活性成份。依據於此，本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素顯示與該文獻記載的酵素明顯的不同。

上述微生物是採用YM培養基等真菌培養用的一般培養基培養而得。特別是Pichia finlandica培養基中作為碳來源的是用葡萄糖、甘油及甲醇而得到良好的標的酵素。Candida utilis的培養基中作為碳來源的若採用甲醇時特別可得到良好的標的酵素。完全增殖後回收菌體，加入2-巰基乙醇等還原劑，及苯基亞甲基硫醯氟(PMSF)之類的蛋白酶阻斷劑於緩衝液中，使細胞破碎得到無細胞抽出液。由無細胞抽出液依蛋白質溶解度的不同而劃分，以各種色層分析法等適宜的組合方法精製蛋白質。作為依蛋白質溶解度而劃分的方法有如利用丙酮及二甲基亞砷(DMSO)之類的有機溶劑進行沉澱及利用硫化銨進行鹽析等皆可。另一方面色層分析法已知可採用陽離子交換法，陰離子交換法，通過膠體法，疏水性色層分析法、螯合、色素、抗體等多種親和力色層分析法等。更具體的說，舉例而言有經過利用PMSF的疏水性色層分析法、利用DEAE-瓊脂糖(DEAE-Sepharose)的陰離子交換色層分析法、利用丁基



## 五、發明說明 (16)

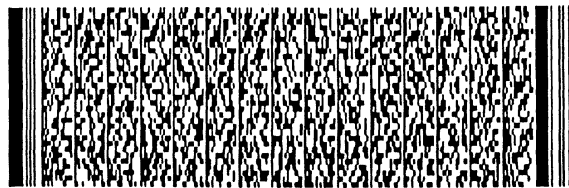
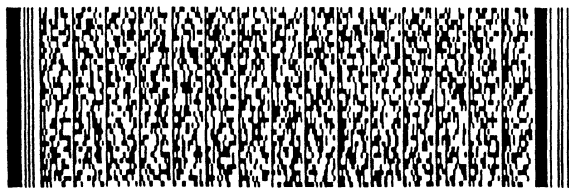
-TOYOPEARL 的疏水性色層分析法、利用藍-瓊脂糖(Blue-Sepharose)的親和力色層分析法、利用Superdex 200 的膠體過濾等等後，使得到電泳結果為單一條帶的精製結果。

本發明是有關於(R)-2-辛醇脫氫酵素編碼的多核苷酸及其同質體(homoplog)。本發明中的多核苷酸可以是含有DNA及RNA之類天然存在的多核苷酸，也可以是含有人工合成的核苷酸衍生物的多核苷酸。

本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素編碼的多核苷酸是含有如序列編號：1所示的鹽基序列。序列編號：1所示的鹽基序列是含有序列編號：2所示的胺基酸序列之蛋白質編碼後，含有此胺基酸序列的蛋白質構成本發明中(R)-2-辛醇脫氫酵素的最佳狀態。

本發明的多核苷酸是具有序列編號：2所記載的胺基酸序列中含有1個或者是多數的胺基酸缺失、置換、插入及/或附加胺基酸序列，且具有前述物理化學性質(1)-(2)之蛋白質編碼的多核苷酸。對於從業者而言，可以利用由序列編號：1所記載的鹽基序列之DNA部位特異的變異導入法(Nucleic Acid Res. 10, pp.6487 (1982), Methods in Enzymol. 100, pp.448 (1983), Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), PCR A Practical Approach IRL Press pp. 200 (1991))等等，適當的導入置換、缺失、插入及/或附加變異。

此外，本發明的多核苷酸是含有由序列編號：1所示

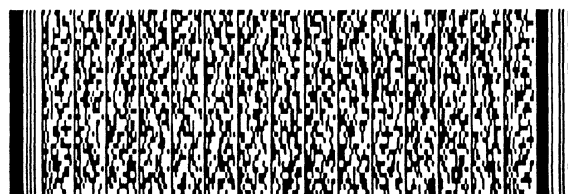
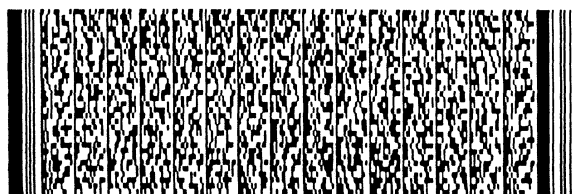


## 五、發明說明 (17)

鹽基序列中之DNA與在嚴苛條件下雜交得到的多核苷酸，且具有前述物理化學性質(1)-(2)之蛋白質編碼的多核苷酸。在嚴苛條件下雜交得到的多核苷酸是指序列編號：1所記載的鹽基序列中任意至少20個，最好是至少30個，例如在40、60甚至100個的連續序列中選擇一個或多個DNA作成DNA探針，採用如ECL直接核酸標示及偵測系統(Amersham Pharmacia Biotech公司製)，依手冊記載的條件下(wash: 42℃、含有0.5x SSC的初級清洗條件)，雜交得到的多核苷酸。

在嚴苛條件下，與序列編號：1所記載鹽基序列中之DNA雜交的多核苷酸是含有與序列編號：1具有類似鹽基序列的多核苷酸。這樣的多核苷酸是與序列編號：2之胺基酸的蛋白質具有機能同等之蛋白質編碼的可能性很高。

還有，本發明的多核苷酸是含有與序列編號：2所示胺基酸序列有至少70%，最好是至少80%或是90%，更佳狀態是95%以上同源性之蛋白質編碼的多核苷酸。蛋白質同源性檢索是以例如SWISS-PROT、PIR等關於蛋白質之胺基酸序列的資料庫及DNA Databank of JAPAN(DDBJ)、EMBL、Gene-Bank等的DNA相關資料庫，以DNA序列為原推測胺基酸序列有關的資料庫等為對象，利用FASTA程式及BLAST程式等，例如在網際網路上進行檢索。用序列編號：2所記載的胺基酸序列，以DDBJ為對象，採用BLAST程式進行檢索的結果，已知的蛋白質中顯示具有最高同源性者是枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)的葡萄糖脫氫酶，具有43%相



## 五、發明說明 (18)

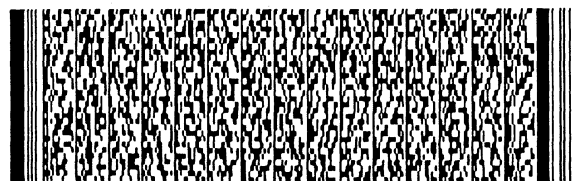
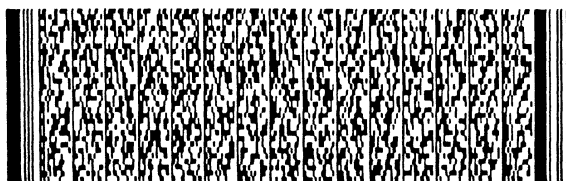
同性及61%陽性。本發明的70%以上同源性是例如以BLAST程式得到的陽性之相同性數值。

本發明中，具有前述物理化學性質(1)-(2)之蛋白質編碼的多核苷酸是特別針對由序列編號：1之鹽基序列多核苷酸的同源性而言。同源性是變異導入之外，序列編號：1所記載鹽基序列為基，由其他生物經PCR選殖及雜交而可分離出者。例如序列編號：1所記載的鹽基序列是由Pichia finlandica分離出之遺傳物質。此外，由Pichia jadinii、念珠菌屬酵母Candida utilis還有歐加鐵屬酵母Ogataea wickerhamii等微生物得到的含有前述物理化學性質(1)-(2)之蛋白質編碼的多核苷酸也都包含在本發明中。

本發明的多核苷酸是對本發明(R)-2-辛醇脫氫酵素之遺傳工程製造有用的多核苷酸。而且依照本發明的多核苷酸，可以做出具有對酮類及醇類製造有用的(R)-2-辛醇脫氫酵素活性的微生物遺傳工程。

本發明是含有具有序列編號：2所記載的胺基酸，且具有前述物理化學性質(1)-(2)的(R)-2-辛醇脫氫酵素，及其同質體。含有序列編號：2所示胺基酸的蛋白質是構成依照本發明之(R)-2-辛醇脫氫酵素的最佳狀態。

本發明之(R)-2-辛醇脫氫酵素的同質體是含有序列編號：2所記載的胺基酸序列中，1個或者是多個胺基酸缺失、置換、插入及/或附加胺基酸序列。對於從業者而言，可以利用由序列編號：1所記載的鹽基序列之DNA部位特異

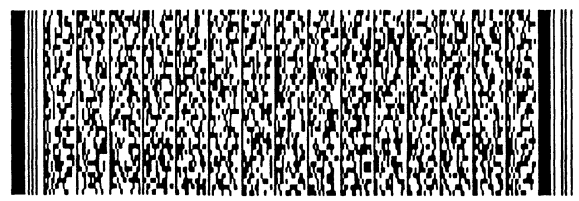
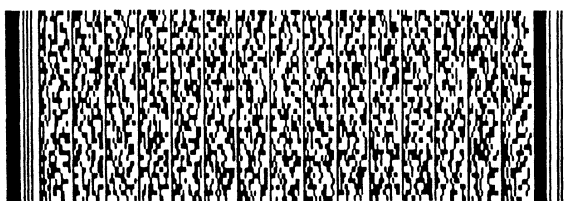


## 五、發明說明 (19)

的變異導入法(Nucleic Acid Res. 10, pp.6487 (1982), Methods in Enzymol. 100, pp.448 (1983), Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), PCR A Practical Approach IRL Press pp. 200 (1991))等等，適當的導入置換、缺失、插入及/或附加變異，而得到(R)-2-辛醇脫氫酵素的同質體編碼DNA。以此(R)-2-辛醇脫氫酵素的同質體編碼DNA導入宿主，表現可以得到序列編號：2記載的(R)-2-辛醇脫氫酵素的同質體。

此外，本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素的同質體是指具有序列編號：2所示胺基酸序列至少70%，最好是至少80%或是90%，更佳狀態是95%以上同源性之蛋白質。蛋白質同源性檢索是以例如SWISS-PROT、PIR等關於蛋白質之胺基酸序列的資料庫及DNA Databank of JAPAN(DDBJ)、EMBL、Gene-Bank等的DNA相關資料庫，以DNA序列為原推測胺基酸序列有關的資料庫等為對象，利用FASTA程式及BLAST程式等，例如在網際網路上進行檢索。用序列編號：2所記載的胺基酸序列，以DDBJ為對象，採用BLAST程式進行檢索的結果，已知的蛋白質中顯示具有最高同源性者是枯草桿菌的葡萄糖脫氫酶，具有43%相同性及61%陽性。本發明的70%以上同源性是例如以BLAST程式得到的陽性之相同性數值。

本發明之(R)-2-辛醇脫氫酵素編碼DNA是以下列敘述的方法分離而得的。



## 五、發明說明 (20)

本發明的酵素精製後，N端胺基酸解析後，再以內胜肽內切酶、V8蛋白酶切斷，以逆相液體色層分析法等將胜肽斷片精製後，再用蛋白質定序儀解析胺基酸序列，而決定多數的胺基酸序列。

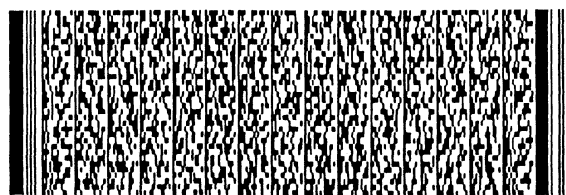
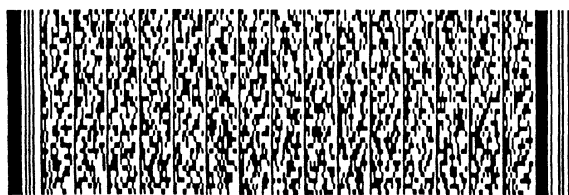
了解部分的胺基酸序列後，就可以依據於此推定編碼鹽基序列。以推定的鹽基序列，還有序列編號：1所示的鹽基序列為原，設計PCR用的引子，再以酵素生產株的染色體DNA或者是cDNA資料庫為模板，進行PCR而得到本發明DNA的一部份。

再來，以得到的DNA斷片作為探針，將酵素生產株染色體DNA的限制酶切割產物導入噬菌體、質體，利用轉形至大腸菌而得到的資料庫及cDNA資料庫，進行菌落雜交法、阻斷雜交法等，而得到本發明的DNA。

此外，以PCR得到之DNA斷片的鹽基序列解析後，由得到的序列設計為由已知DNA向外側延伸的PCR引子，將酵素生產株染色體DNA以適當限制酶消化後，以自身環化反應將DNA作為模板進行逆向PCR (Genetics 120, 621-623 (1988))，此外，再以RACE法(Rapid Amplification of cDNA End, 「PCR實驗手冊」p25-33, HBJ出版社)等也可以得到本發明DNA。

而且本發明的DNA是以上述各種方法選殖基因體DNA，或是cDNA合成而得。

以這樣的方法分離後，將本發明之(R)-2-辛醇脫氫酵素編碼DNA插入已知的表現載體，則提供了(R)-2-辛醇脫



## 五、發明說明 (21)

氫酵素表現載體。此外，以此表現載體培養轉形來的轉形體，可以得到本發明(R)-2-辛醇脫氫酵素的重組體。

為了本發明中表現以 $\text{NAD}^+$ 作為輔酶的(R)-2-辛醇脫氫酵素，作為其轉形對象的微生物是含有具有以 $\text{NAD}^+$ 作為輔酶之(R)-2-辛醇脫氫酵素活性的多核苷酸編碼DNA經過重組載體的轉形，可以表現以 $\text{NAD}^+$ 作為輔酶的(R)-2-辛醇脫氫酵素，並沒有特定限制。可能被利用微生物有如下列所示的微生物。

艾歇利希氏菌屬(Escherichia)

桿菌屬(Bacillus)

假單胞菌屬(Pseudomonas)

沙雷氏菌屬(Serratia)

短菌屬(Brevibacterium)

棒狀桿菌屬(Corynebacterium)

鏈球菌屬(Streptococcus)

乳酸桿菌屬(Lactobacillus)等宿主載體的開發細菌

紅球菌屬(Rhodococcus)

鏈黴菌屬(Streptomyces)

釀母菌屬(Saccharomyces)

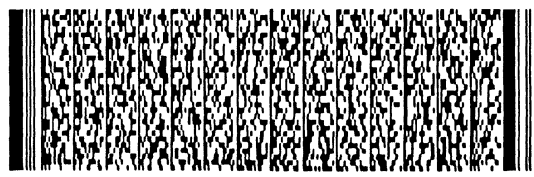
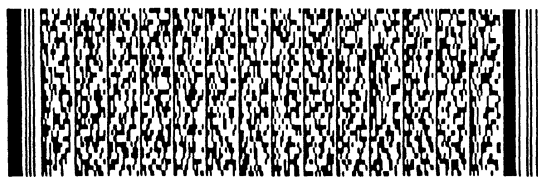
柯魯弗氏黴菌屬(Kluyveromyces)

裂殖釀母菌屬(Schizosaccharomyces)

接合釀母菌屬(Zygosaccharomyces)

亞若維亞屬(Yarrowia)

毛孢子菌屬(Trichosporon)



## 五、發明說明 (22)

紅孢子菌屬(Rhodosporidium)

比齊酵母菌屬(Pichia)

念珠菌屬(Candida)

神經孢子菌屬(Neurospora)

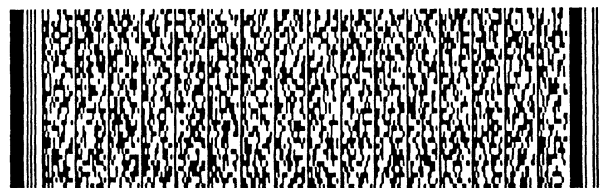
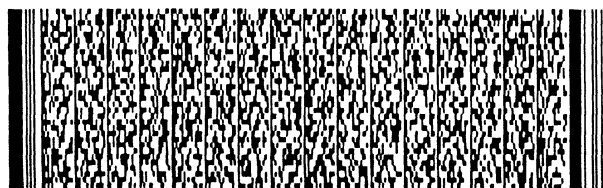
麴菌屬(Aspergillus)

頭孢子菌屬(Cephalosporium)

木黴屬(Trichoderma)等等宿主載體系統開發的黴菌

。

轉形體的製作順序及適合宿主的重組載體構築是以分子生物學、生物工程、遺傳工程的領域中慣用的技術為準而進行實驗(例如, Sambrook等, Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratories)。微生物等中, 為了本發明中以 $\text{NAD}^+$ 作為輔酶的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的表現, 首先將此DNA導入微生物中安定存在的質體載體或噬菌體載體中, 此遺傳訊息之轉錄、轉譯所需訊息也是必要存在的。因此, 將具有調控轉錄、轉譯之單位的啟動子置於本發明DNA鏈的5'端側上游, 更佳的狀態是將終止子置於3'端側下游, 分別組合而得。作為此啟動子、終止子者, 是利用作為宿主的微生物中已知的機能而採用必要的啟動子、終止子。有關於這些種種微生物中可能利用的載體、啟動子、終止子等在「微生物學基礎講座8基因工程·共立出版」, 特別是有關於酵母者在Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990)、Yeast 8, 423-488 (1992)等有詳細的記載。



## 五、發明說明 (23)

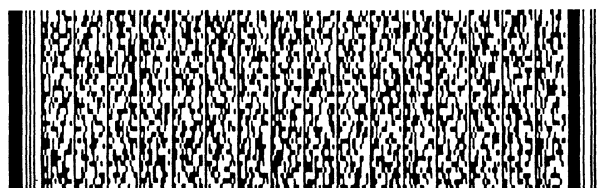
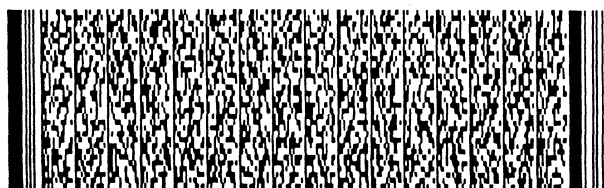
例如艾歇利希氏菌(Escherichia)屬，特別是大腸桿菌(Escherichia coli)中，作為質體載體者，可以利用pBR、pUR系統的質體，並利用lac( $\beta$ -半乳糖酶)、trp(色胺酸操縱子)、tac、trc(lac、trp的融合)、 $\lambda$ 噬菌體的PL、PR等等由來的啟動子。此外，作為終止子者可以採用trpA由來、噬菌體由來、rrnB核糖體RNA由來的終止子等。

桿菌屬中，作為載體可以利用pUB110系統的質體、pC194系統的質體等，都具有插入至染色體中的能力。此外，作為啟動子、終止子者可以利用apr(鹼性蛋白酶)、npr(中性蛋白酶)、amy( $\alpha$ -澱粉酶)等。

假單胞菌屬中開發出了惡臭假單胞菌(Pseudomonas putida)、洋蔥假單胞菌(Pseudomonas cepacia)等宿主載體系統。以有關甲苯化合物分解的質體TOL質體為基本，有廣泛宿主範圍的載體(含有RSF1010等由來的自律複製必要基因)如pKT240等可以利用，並利用其啟動子、終止子、脂肪酶(特開平5-284973)基因。

短菌屬中，特別是Brevibacterium lactofermentum中可以利用pAJ43 (Gene 39, 281(1985))等質體載體。作為其啟動子、終止子者可利用大腸菌使用的啟動子、終止子等。

棒狀桿菌屬特別是產麩胺酸棒狀桿菌(Corynebacterium glutamicum)中可能可以利用的有pCS11(特開昭57-183799)、pCB101(Mol. Gene. Genet.



## 五、發明說明 (24)

196, 175 (1984)) 等質體載體。

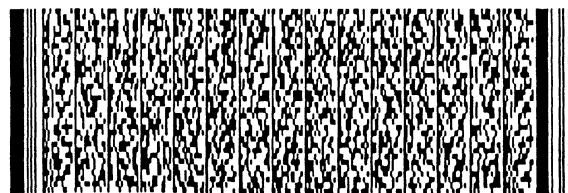
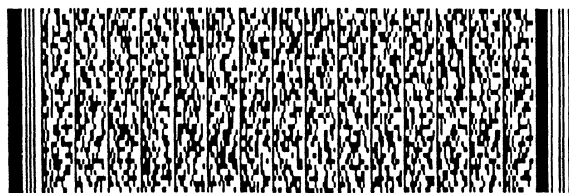
鏈球菌(Streptococcus)屬中可能可以利用的有 pHV1301(FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985))、pGK1(Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)) 等質體載體。

乳酸桿菌(Lactobacillus)屬中，可以利用鏈球菌屬開發的pAM  $\beta$ 1(J. Bacteriol. 137, 614 (1979))等，其啟動子可以採用大腸菌所用者。

紅球菌(Rhodococcus)屬中，可以利用Rhodococcus rhodochrous分離出的質體載體(J. Gen. Microbiol. 138, 1003 (1992))。

鏈黴菌(Streptomyces)屬中，依照Hopwood等人的 Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratories (1985)記載的方法，可以構築質體。特別是Streptomyces lividans中可以利用pIJ486 (Mol. Gen. Genet. 203, 468-478, 1986)、pKC1064(Gene 103, 97-99 (1991))、pUWL-KS (Gene 165, 149-150 (1995))等。Streptomyces virginiae中，也可以採用同樣的質體(Actinomycetol. 11, 46-53 (1997))。

釀母菌(Saccharomyces)屬，特別是啤酒釀母菌(Saccharomyces cerevisiae)中，可以採用YRp系統、YEp系統、YCp系統、YIp系統等之質體，與利用染色體內有許多備份(copy)之核糖體DNA的相同重組之嵌入載體(EP



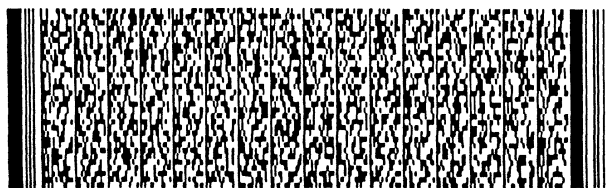
## 五、發明說明 (25)

537456等)是導入多備份基因，且保持安定的基因極有用方法。此外，可以利用ADH(醇脫氫酵素)、GAPDH(甘油醛-3-磷酸脫氫酵素)、PHO(酸性磷酸酶)、GAL( $\beta$ -半乳糖酶)、PGK(磷酸甘油激酶)、ENO(烯醇酶)等的啟動子、終止子。

柯魯弗氏菌屬，特別是Kluyveromyces lactis中，可以利用以啤酒釀母菌由來2  $\mu$ m系統質體、pKD1系統質體(J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981))、有關殺手細胞活性之pGK11由來質體、柯魯弗氏菌屬中自律增殖基因KARS系統的質體、核糖體DNA等的相同重組而可嵌入染色體中的載體質體(EP 537456等)等。此外，可以利用ADH、PGK等由來的啟動子、終止子。

裂殖酵母菌(Schizosaccharomyces)屬中，可以利用含有裂殖酵母由來的ARS(與自律複製有關的基因)及啤酒釀母菌由來的營養要求性相補選擇標記的質體載體(Mol. Cell. Biol. 6, 80 (1986))。此外，可利用裂殖酵母由來的ADH啟動子(EMBO J. 6, 729 (1987))。特別是，pAUR224是由寶酒造販售而易於取得利用。

接合釀母菌(Zygosaccharomyces)屬中，可以利用接合釀母菌Zygosaccharomyces rouxii由來的pSB3(Nucleic Acids Res. 13, 4267 (1985))等由來的質體載體，並且可以採用啤酒釀母菌由來之PHO5啟動子、及Zygosaccharomyces rouxii由來之GAP-Zr(甘油醛-3-磷酸脫氫酵素)的啟動子(Agric. Biol. Chem. 54, 2521



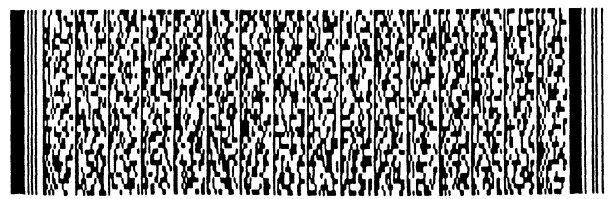
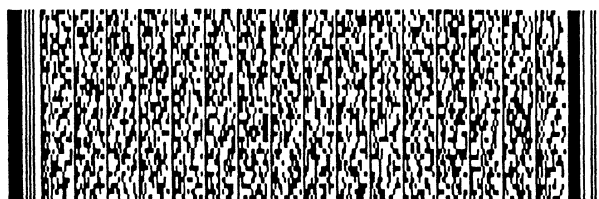
## 五、發明說明 (26)

(1990)) 等。

比齊酵母菌(*Pichia*)屬中，利用*Pichia pastoris*等比齊酵母菌由來與自律複製有關基因(PARS1、PARS2)等宿主開發載體系統(Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985))，利用高濃度培養與甲醇誘導可能的AOX反應等強啟動子(Nucleic Acids Res. 15, 3859 (1987))。此外，還有*Pichia angusta* (舊稱*Hansenula polymorpha*)中宿主載體系統的開發。作為載體者也可以利用*Pihia angusta*由來自律複製相關基因(HARS1、HARS2)，但因為比較不安定，必須是多備份嵌入染色體較有效(Yeast 7, 431-443 (1991))。另外，可以利用甲醇等誘導的AOX反應(醇氧化酶)、FDH(甲酸脫氫酵素)的啟動子。

念珠菌(*Candida*)屬中，開發出針對*Candida maltosa*、白色念珠菌(*Candida albicans*)、*Candida tropicalis*、*Candida utilis*等的宿主載體。*Candida Maltosa*中將*Candida maltosa*由來的ARS選殖(Agric. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987))，再利用該序列開發載體。此外，*Candida utilis*中也開發了染色體嵌入型的載體所需的強力啟動子(特開平08-173170)。

麴菌(*Aspergillus*)屬中，黴菌中研究最多的是*Aspergillus niger*、*Aspergillus oryzae*等，可以利用質體或是嵌入染色體，而可以利用菌體外蛋白酶、澱粉酶由來的啟動子(Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989))。



## 五、發明說明 (27)

木黴(*Trichoderma*)屬中，開發出利用木黴*Trichoderma reesei*的宿主載體系統，利用菌體外基因由來的啟動子等(Biotechnology 7, 596-603 (1989))。

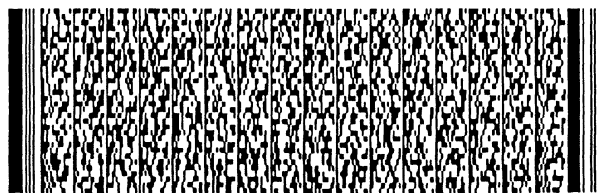
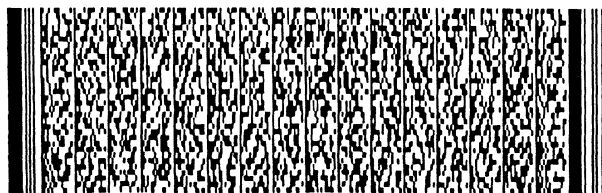
此外，微生物以外，也有利用植物、動物中種種的宿主進行載體系統的開發，特別是用Nature 315, 592-594 (1985) 的昆蟲及菜種，在植物中表現大量異種蛋白質系統的開發，都極適於利用。

具有本發明中使用的4-鹵化醯基乙酸酯還原酶生產能力的微生物是屬於具有NAD<sup>+</sup>依存性(R)-2-辛醇脫氫酵素生產能力的比齊酵母菌屬、念珠菌屬及歐加鐵屬的菌株、突變株、變種或是利用基因操作技術而作成，獲得含有本發明酵素生產能力的轉形株。

此外，以上述方法得到的本發明表現的(R)-2-辛醇脫氫酵素菌株是利用於本發明酵素的製造，及以下所述2級醇類、及酮類的製造。

也就是說，本發明是有關於利用前述(R)-2-辛醇脫氫酵素進行酮類的還原而得級醇類的製造方法。本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素是利用比NADPH便宜且安定的NADH作為輔酶，所以在工業的利用上較有利。以本發明的酵素、含酵素的培養物、其處理物與反應溶液相接觸，可以進行標的酵素的反應。

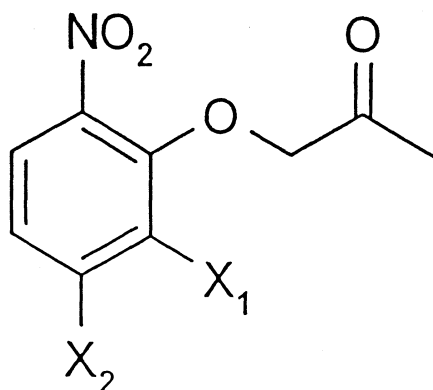
而且，酵素與反應溶液的接觸形態並不限於此處所示的具體例。反應溶液是相當於使基質與酵素反應必要的輔酶NADH能發揮其酵素活性的環境而使之溶解於適當溶劑。



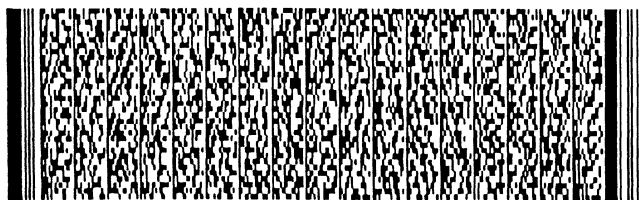
## 五、發明說明 (28)

對於含有本發明(R)-2-辛醇脫氫酵素之微生物處理物而言，具體的說是含有以界面活性劑及甲苯等有機溶劑處理使細胞膜滲透性被改變的微生物，還有以玻璃珠及酵素處理菌體使之破碎得到無細胞抽出液及其部份精製的物質。

作為本發明2級醇類製造方法中的酮類是醯基苯、2-辛酮、4-鹵化醯基乙酸酯衍生物、如一般式I



(式中，X1及X2分別代表鹵素原子之意)所示的丙酮基氧基苯衍生物、溴化甲基環丙基酮、2-乙醯基丁丙酯、5-氯化-2-戊酮等皆適用。而且，本發明的4-鹵化乙醯基乙酸酯衍生物是指乙醯基乙酸酯的第4位以任意鹵素原子置換。此外，構成前述乙醯基乙酸酯的醇類為任意醇類皆可。作為4-鹵化乙醯基乙酸酯衍生物的鹵素可以是如溴、氯



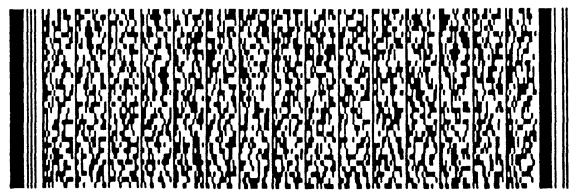
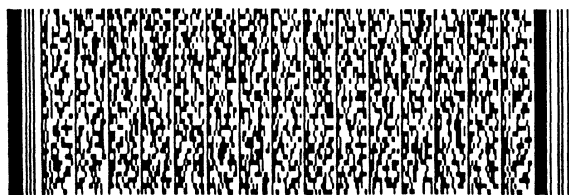
## 五、發明說明 (29)

、碘等，特別以氯最適用。作為酯類者可以是含有如甲酯、乙酯、丙酯、異丙酯、丁酯、辛酯、苄酯等的直鏈、分支鏈、芳香族置換之醇類酯，以乙酯最為適用。作為4-鹵化乙酰基乙酸酯衍生物者可以是含有如第2位是直鏈或者是分支鏈的烷基，含有氯、溴、碘等的鹵素的衍生物等。

作為丙酮基氧基苯衍生物的鹵素可以是溴、氯、碘、氟等，特別以氯最適用。特別是，2-丙酮基氧基-3, 4-二氟化硝基苯是合成抗菌劑的合成中間產物2, 3-二氟-6-硝基-[[ $(R)$ -2-氫氧基丙基]氧基]苯，是相當有用的化合物。

此外本發明是有關於前述以 $(R)$ -2-辛醇脫氫酵素之2級醇類氧化得到酮類的製造方法。此外，本發明的 $(R)$ -2-辛醇脫氫酵素可以是產生該酵素的微生物或者是其處理物作用於2級醇，而製造出反應產物的酮類。作為本發明中基質的2級醇類者可以採用2-丙醇、2-丁醇、2-辛醇、1-苯基乙醇等，有鹵素、芳香族置換的烷基醇等。

更進一步，本發明的酵素，還有產生該酵素的微生物或者是其處理物是以外消旋體的醇類作為基質，利用採用 $(R)$ -2-辛醇脫氫酵素的不齊氧化之光學活性醇的生產。也就是說，本發明的酵素是光學異性體的一方優先氧化，取得殘存的光學活性醇，而生產光學活性醇。更具體的說，將2-辛醇還有1-苯基乙醇的 $(S)$ 體與 $(R)$ 體混在一起的消旋體，以本發明的 $(R)$ -2-辛醇脫氫酵素於 $NAD^+$ 共存下作用。由於立體選擇性較優良的本發明 $(R)$ -2-辛醇脫氫酵素是對



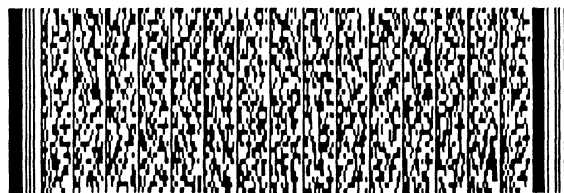
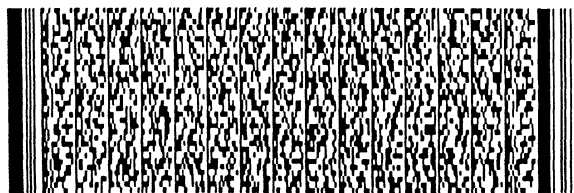
## 五、發明說明 (30)

於(R)體有特異性的作用，將之氧化成酮類，而對(S)體的醇類不作用，所以不久之後(S)體所佔的比例就會變大。如此而來，若將累積的(S)體分離，最終可以回收由消旋體得到之(S)體的醇類。如此可以由(RS)-2-辛醇得到(S)-2-辛醇、由(RS)-苯基乙醇得到(S)-苯基乙醇等。

而且本發明中「光學活性醇」是指含有某種光學異性體多於其他光學異性體的醇類，以50%以上為佳，90%以上更佳，最佳狀態是含有95%以上的光學純度(enantiomeric excess; ee)之醇。另外，本發明的「光學異性體」是指一般稱為「光學活性體」及「鏡像異性體」的情形。

前述本發明的酮類製造方法中，可以組合NADH的再生系統。隨著以(R)-2-辛醇脫氫酵素進行的氧化反應，由NAD<sup>+</sup>生成NADH。由NADH生成NAD<sup>+</sup>的再生是由微生物中含有的NADH再生NAD<sup>+</sup>的酵素(系統)進行的。此外，以具有由NADH生成NAD<sup>+</sup>能力的微生物或者是酵素，例如可以添加麩胺酸脫氫酵素、NADH氧化酶、NADH脫氫酵素等反應系統來進行反應。此外，利用本發明酵素基質特異性，在反應系統中添加2-辛醇、乙醯苯酮等還原反應之基質，以該酵素本身同時進行由NADH生成NAD<sup>+</sup>的再生。

同樣的在醇類的製造方法中，也可以組合NAD<sup>+</sup>的再生系統。伴隨著還原反應，由NADH生成NAD<sup>+</sup>。由NAD<sup>+</sup>進行NADH的再生是採用微生物具有的NAD<sup>+</sup>還原能(解糖系統等)來進行。這種NAD<sup>+</sup>還原能是在反應系統中添加葡萄糖或是乙醇，而可以增強反應。此外，添加具有由NAD<sup>+</sup>生成NADH



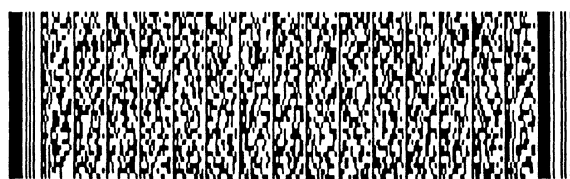
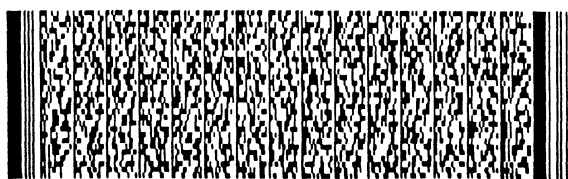
## 五、發明說明 (31)

能力的微生物及其處理物、酵素於反應系統中也可以進行反應。採用含有甲酸脫氫酵素、葡萄糖脫氫酵素、頻果酸脫氫酵素、甘油脫氫酵素、醇脫氫酵素等微生物，其處理物，及其精製酵素亦可進行NADH的再生。例如，採用上述葡萄糖脫氫酵素時，利用由葡萄糖變換成 $\delta$ -葡萄糖內酯( $\delta$ -gluconic lactone)的反應，可以進行NADH的再生。

此外，利用本發明(R)-2-辛醇脫氫酵素的性質，在反應系統中添加2-辛醇等本發明酵素之氧化反應的基質，採用該酵素本身也可以進行NADH的再生。

這種NADH的再生所必要的反應構成成分可以是添加於本發明中醇類製造的反應系統中，或者是添加固定化的物質。還可以介入能進行NADH交換的膜，與之接觸而進行反應。

此外，以含有本發明DNA之重組載體轉形的微生物，於生存狀態下利用前述醇類製造方法的情形下，也可以不添加為NADH再生而附加的反應系統。也就是說，採用NADH再生活性高的微生物，再用轉形體進行還原反應，如此將不用添加NADH再生用的酵素而能有效率的進行反應。而且，同時導入NADH再生可能利用的葡萄糖脫氫酵素、甲酸脫氫酵素、醇脫氫酵素、胺基酸脫氫酵素、有機酸脫氫酵素(頻果酸脫氫酵素等)等的基因，與本發明的NAD<sup>+</sup>依存性(R)-2-辛醇脫氫酵素編碼DNA於宿主中，更有效率的NADH再生酵素與NAD<sup>+</sup>依存性(R)-2-辛醇脫氫酵素，也發現可以進行還原反應。這種2種或者是以上的基因導入宿主



## 五、發明說明 (32)

，可以是利用避開不合性之複製起源的多數載體導入不同基因之重組載體轉形至宿主的方法，及單一載體導入兩基因的方法，或者是兩方的基因導入染色體的方法等方法。

本發明中作為可以利用於NADH再生的葡萄糖脫氫酵素者，可以是所示的枯草桿菌(Bacillus subtilis)由來之葡萄糖脫氫酵素。此外，作為甲酸脫氫酵素者為所示的Mycobacterium vaccae由來之甲酸脫氫酵素。這種酵素編碼之基因已經被分離。還有基於已經明瞭其鹽基序列，以PCR及雜交篩選法，可以由該微生物取得。

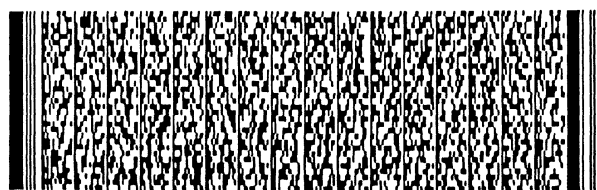
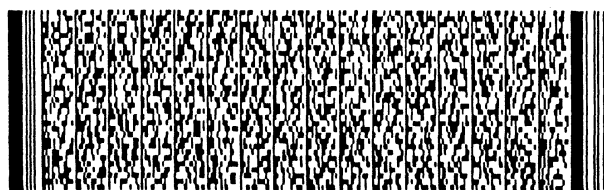
單一載體中導入多數基因的情形時，表現可以利用將啟動子、終止子等表現與調控有關的區域分別將基因連結起來的方法，及利用如乳糖操縱子含有多數作用子之操縱子的方法。

採用本發明酵素的氧化反應或是還原反應是在水中或是在難以溶解於水的有機溶劑，例如在乙酸乙基酯、乙酸丁基酯、甲苯、三氯甲烷、正-己烷等有機溶劑中，或者是與乙醇及丙酮等水性溶劑兩相混合系統中進行反應。

本發明的反應也可以利用固定化酵素、膜反應器等而進行反應。

以本發明(R)-2-辛醇脫氫酵素進行的酵素反應是以下列條件進行的。

- 反應溫度: 4-60 °C，以10-37 °C 為佳
- pH: 3-11，以5-10 為佳，再來是pH 6.0-9.0 亦佳
- 基質濃度: 0.01-90%，以0.1-30% 為佳



## 五、發明說明 (33)

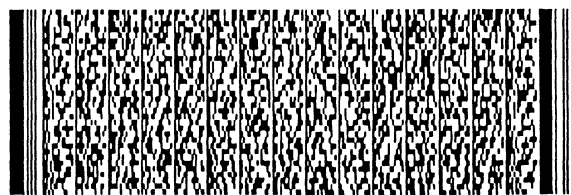
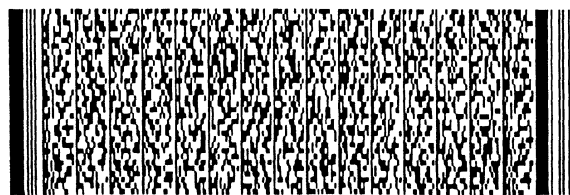
反應系統中，必要的對應輔酶 $\text{NAD}^+$ 或是 $\text{NADH}$ 為 $0.001\text{ mM}$ - $100\text{ mM}$ ，以添加 $0.01$ - $10\text{ mM}$ 為佳。此外，基質可以是在反應開始時一起添加，希望反應液中基質濃度不要過高也可以連續的、或者是非連續的添加。

為使 $\text{NADH}$ 再生而在反應系統中添加的化合物，例如利用葡萄糖脫氫酵素時的葡萄糖，利用甲酸脫氫酵素時的甲酸，利用醇脫氫酵素時的乙醇或者是2-丙醇等，是以添加對作為基質之酮的莫耳比為 $0.1$ - $20$ ，最好是 $0.5$ - $5$ 倍過剩的添加。 $\text{NADH}$ 再生用的酵素，例如葡萄糖脫氫酵素、甲酸脫氫酵素、醇脫氫酵素等，是與本發明的 $\text{NAD}^+$ 依存性(R)-2-辛醇脫氫酵素比較之下酵素活性 $0.1$ - $100$ 倍的添加，最好是 $0.5$ - $20$ 倍程度的添加。

以本發明酮類還原反應而生成的醇類，外消旋體醇之不齊氧化反應而生成的醇類的精製，是將菌體、蛋白質經離心、膜處理等步驟分離，溶劑抽出，蒸餾等方法適當組合而進行的精製。

例如4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯是含有微生物菌體的反應液經離心分離，去除微生物菌體，於上清液添加乙酸乙基、甲苯等溶劑，抽出含4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯的溶劑層。再將之互相分離，蒸餾後，就可以得到純度高的4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯精製產物。

這種利用各種合成反應所得到的本發明酵素是不限於精製酵素，部分精製酵素、含本酵素的微生物菌體、其處理物皆包括在內。而且本發明中所稱的處理物之用語是指



## 五、發明說明 (34)

菌體、精製酵素、還有部分精製酵素等種種方法固定化處理之物質的總稱。構成本發明酵素反應的酵素也可以採用固定化的方法。酵素固定化的方法亦是沒有特定限制的。例如，採用戊二醛、丙烯醯胺、 $\kappa$ -角叉菜膠( $\kappa$ -carrageenin)、褐藻酸鈣(alginic calcium)、離子交換樹脂、氟鎂石(sellaite)等已知的酵素固定化方法。本發明的反應也可以利用膜反應器進行。能構成膜反應器的膜可以是如限外濾過膜、疏水性膜、陽離子膜、毫微過濾膜(nanofiltration)(J. Ferment. Bioeng. 83, 54-58 (1997))等皆可。

而且本專利說明書中所引用的全部先行技術文獻可參照本專利說明書中的組合。

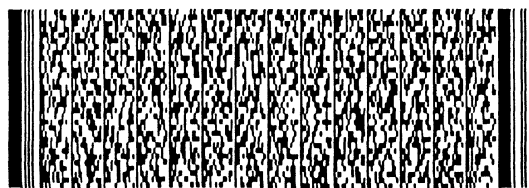
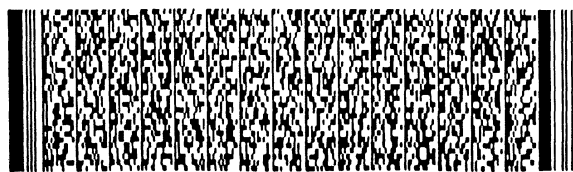
## 圖面的簡單說明

圖1表示由Pichia finlandica精製(R)-2-辛醇脫氫酵素的酵素活性受pH變化影響的示意圖。縱軸表示將(R)-2-辛醇脫氫酵素的最大活性當作100時的相對活性。

圖2表示由Pichia finlandica精製(R)-2-辛醇脫氫酵素的4-氯化乙醯乙酸乙基還原活性受pH變化影響的示意圖。縱軸表示最大活性當作100時的相對活性。

圖3表示由Pichia finlandica精製(R)-2-辛醇脫氫酵素的酵素活性受氧化活性溫度變化影響的示意圖。縱軸表示最大活性當作100時的相對活性。

圖4表示由Pichia finlandica精製(R)-2-辛醇脫氫酵素的4-氯化乙醯乙酸乙基還原活性受溫度變化影響的示意



## 五、發明說明 (35)

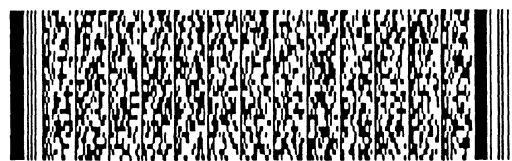
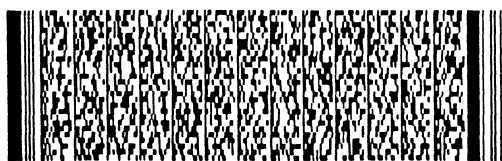
圖。縱軸表示最大活性當作100時的相對活性。

圖5表示由Pichia finlandica精製(R)-2-辛醇脫氫酵素之殘存活性的示意圖。縱軸表示未處理的酵素活性當作100時的殘存活性。

圖6表示Pichia finlandica由來之(R)-2-辛醇脫氫酵素基因導入之質體(pSE-PF01)的構築圖。質體的圖譜中，P(trc)表示trc啟動子、T(rrnB)表示rrnBT1T2終止子、Amp表示安比西林(Ampicillin)抵抗性 $\beta$ -乳糖酶基因、ori表示質體複製起點、rop表示ROP-蛋白質基因、lapIq表示乳糖抑制子。pSE-PF01中的PfODH表示Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因。

圖7表示Pichia finlandica由來之(R)-2-辛醇脫氫酵素基因導入之質體(pSE-PF02)的構築圖。質體的圖譜中，P(trc)表示trc啟動子、T(rrnB)表示rrnBT1T2終止子、Amp表示安比西林抵抗性 $\beta$ -乳糖酶基因、ori表示質體複製起點、rop表示ROP-蛋白質基因、lapIq表示乳糖抑制子。pSE-PF02中的PfODH表示Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因。

圖8表示枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素基因導入之質體(pSE-BSG3)的構築圖。質體的圖譜中，P(trc)表示trc啟動子、T(rrnB)表示rrnBT1T2終止子、Amp表示安比西林抵抗性 $\beta$ -乳糖酶基因、ori表示質體複製起點、rop表示ROP-蛋白質基因、lapIq表示乳糖抑制子、而BsGlcDH表示枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素基因。



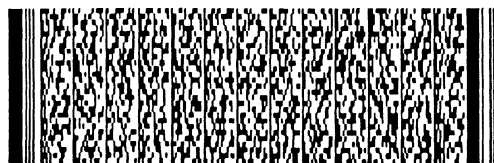
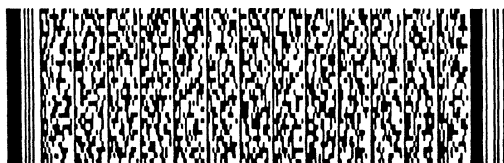
## 五、發明說明 (36)

圖9表示Pichia finlandica由來之(R)-2-辛醇脫氫酵素基因與枯草桿菌由來之葡萄糖脫氫酵素基因導入之質體(pSG-PF01)的構築圖。質體的圖譜中，P(trc)表示trc啟動子、T(rrnB)表示rrnBT1T2終止子、Amp表示安比西林抵抗性 $\beta$ -乳糖酶基因、ori表示質體複製起點、rop表示ROP-蛋白質基因、lapIq表示乳糖抑制子、而BsGlcDH表示枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素基因、PfODH表示Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因。

圖10表示Pichia finlandica由來之(R)-2-辛醇脫氫酵素基因與枯草桿菌由來之葡萄糖脫氫酵素基因導入之質體(pSG-PF02)的構築圖。質體的圖譜中，P(trc)表示trc啟動子、T(rrnB)表示rrnBT1T2終止子、Amp表示安比西林抵抗性 $\beta$ -乳糖酶基因、ori表示質體複製起點、rop表示ROP-蛋白質基因、lapIq表示乳糖抑制子、而BsGlcDH表示枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素基因、PfODH表示Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因。

圖11表示Mycobacterium vaccae由來之甲酸脫氫酵素基因導入之質體(pSE-MCF15)的構築圖。質體的圖譜中，P(trc)表示trc啟動子、T(rrnB)表示rrnBT1T2終止子、Amp表示安比西林抵抗性 $\beta$ -乳糖酶基因、ori表示質體複製起點、rop表示ROP-蛋白質基因、lapIq表示乳糖抑制子。McFDH表示Mycobacterium vaccae由來的甲酸脫氫酵素基因。

圖12表示Pichia finlandica由來之(R)-2-辛醇脫氫



## 五、發明說明 (37)

酵素基因與Mycobacterium vaccae由來之甲酸脫氫酵素基因導入之質體(pSF-PF02)的構築圖。質體的圖譜中，P(trc)表示trc啟動子、T(rrnB)表示rrnBT1T2終止子、Amp表示安比西林抵抗性 $\beta$ -乳糖酶基因、ori表示質體複製起點、rop表示ROP-蛋白質基因、lapIq表示乳糖抑制子、而McFDH表示Mycobacterium vaccae由來的甲酸脫氫酵素基因、PfODH表示Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因。

圖13表示由Candida utilis精製(R)-2-辛醇脫氫酵素的酵素活性受pH變化影響的示意圖。縱軸表示最大活性當作100時的相對活性。

圖14表示由Candida utilis精製(R)-2-辛醇脫氫酵素的4-氯化乙醯乙酸乙基還原活性受pH變化影響的示意圖。縱軸表示最大活性當作100時的相對活性。

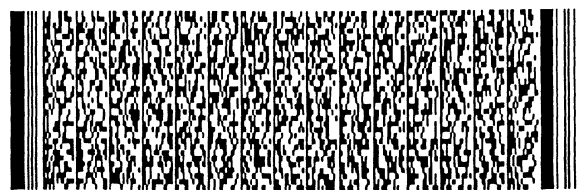
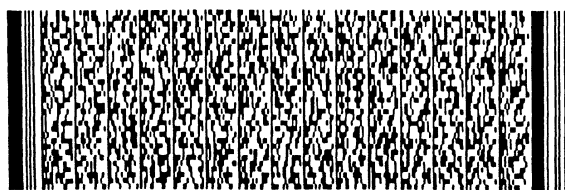
實施發明的最佳狀態

以下將以實施例對本發明做更詳細的說明，但是本發明並不限於實施例中所述的狀態。

[實施例1](R)-2-辛醇脫氫酵素的篩選

以電泳及(R)還有(S)-2-辛醇的基質，與含有 $\text{NAD}^+$ ，吩嗪甲硫酸(phenazine methosulfate)(PMS)，氮藍四唑(nitroblue tetrazolium)(NBT)的反應液依酵素活性染色法，進行由酵母中的(R)-2-辛醇脫氫酵素篩選的工程。反應液組成依照以下所列。

· 反應液：



## 五、發明說明 (38)

(S)- 或(R)-2- 辛醇 5mM

NAD<sup>+</sup> 1.3mM

PMS 0.13mM

NBT 0.48mM

其結果顯示，基質為(S)-2-辛醇之時幾乎都不會被染色，為(R)-2-辛醇之時會優先被染色的酵素發現是以下所列的酵母菌株。此外，這些具有(R)-2-辛醇脫氫酵素活性的酵素，亦具有將4-氯化乙醯乙酸乙基還原而生成(S)-4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基的活性。

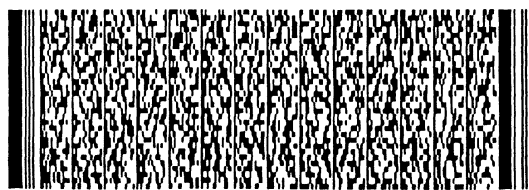
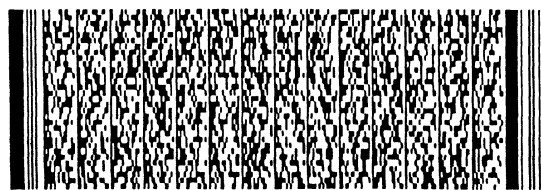
- Pichia finlandica: DSM 70280, DSM 1380
- Pichia jadinii: DSM 2361, DSM 70167, IFO 0987
- Candida utilis: IFO 0988, IFO 0626
- Ogataea wickerhamii: IFO 1706

[ 實施例2 ] 生產(R)-2-辛醇脫氫酵素的培養條件

將實施例1所記載的(R)-2-辛醇脫氫酵素生產菌株於作為碳來源的2%葡萄糖，改為2%甘油，或1%甲醇進行培養。其結果顯示，對於Pichia finlandica而言，不論何種培養基皆可以誘導出標的酵素。另一方面，對於Candida utilis而言，作為碳來源用甲醇時會強力誘導標的酵素。

[ 實施例3 ] 由Pichia finlandica進行(R)-2-辛醇脫氫酵素的精製

Pichia finlanica DSM 70280 株於4.8L的培養基A培養，經離心分離調製菌體。得到的濕菌體於



## 五、發明說明 (39)

100mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)、10% 甘油、1 mM 乙二胺四乙酸二鈉鹽(EDTA·2Na)、0.02% 2-巰基乙醇、2mM PMSF 沉澱，以BEAD-BEATER(Biospec公司製)破碎後，離心分離並除去菌體殘渣，得到無細胞抽出液。再於此無細胞抽出液添加魚精蛋白硫酸，離心分離除去核酸，得到上清。將此上清添加硫化胺至40%~75%飽和得到沉澱的部分。將此沉澱加入含有30%飽和硫化胺的標準緩衝液，得到最終濃度含有40%飽和硫化胺的酵素液。此酵素液離心分離得到上清。將上清以含有30%飽和硫化胺的標準緩衝液平衡後，加入苯基-TOYOPEARL 650M (5.0cmx25cm)，加入飽和硫化胺濃度為30%-0%的溶液分管收集流出液。

使用的培養基A，標準緩衝液的組成是依照以下所列的配方。

## · 培養基A：

酵母精粹物(extract) 10克/升

蛋白胨(Peptone) 20克/升

葡萄糖(glucose) 20克/升

pH 6.0

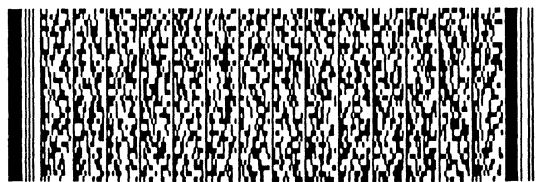
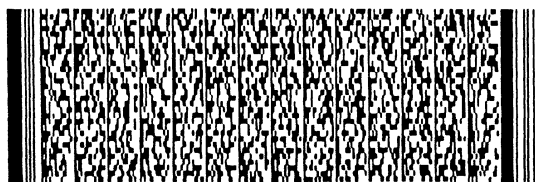
## · 標準緩衝液

Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0) 10mM

2-巰基乙醇 0.01%

甘油 10%

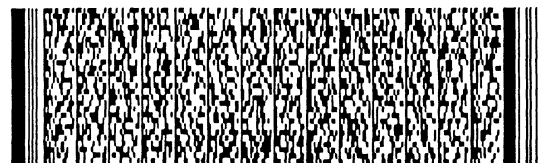
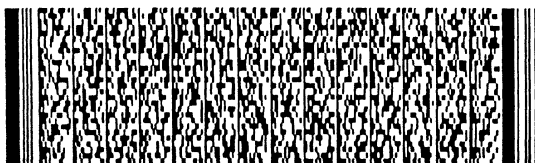
(R)-2-辛醇脫氫酵素活性是看分層溶出得到的部分。將其高峰期的部分回收，經限外濾過濃縮。



## 五、發明說明 (40)

濃縮之酵素液以標準緩衝液透析後，將此酵素液離心分離得到上清。上清以同樣的緩衝液平衡，加入藍-瓊脂糖CL-6B(5cmx10cm)中，再以相同的緩衝液洗淨後，加入濃度為0-1.5M的氯化鈉溶液分管收集流出液。(R)-2-辛醇脫氫酵素活性是將分層溶出部份溶出，再將此部份液體回收，濃縮而得。濃縮的酵素液以標準緩衝液(pH 8.5)透析後，以相同的緩衝液(pH 8.5)平衡再加入DEAE-瓊脂糖 FF (1.6cm x 10cm)，以相同緩衝液(pH 8.5)洗淨後，進行0-1 M氯化鈉濃度分層溶出。(R)-2-辛醇脫氫酵素活性是將單純通過管柱的部份與分層溶出的部份分別溶出，依活性分別回收並濃縮而得。單純通過管柱的部份得到的酵素液分別以superdex 200 (0.32cm x 30cm，SMART system Amersham Pharmacia 公司製)，含0.3M氯化鈉的標準緩衝液進行膠體過濾。以膠體過濾得到的活性分層部份再濃縮精製而得酵素。

最高精製酵素之活性比在(R)-2-辛醇的氧化活性約為91單位/毫克-蛋白質。精製的結果簡要列於表1。



## 五、發明說明 (41)

表1

| 步驟               | 蛋白質量(毫克) | 總活性(單位) | 比活性(單位/毫克) |
|------------------|----------|---------|------------|
| 無細胞抽出液           | 26,900   | 603     | 0.0224     |
| 除去核殼             | 10,900   | 588     | 0.0540     |
| 硫化銨40-75%        | 5,560    | 361     | 0.0649     |
| Phenyl-Toyopearl | 398      | 162     | 0.408      |
| Blue-Sepharose   | 11.7     | 46.9    | 3.59       |
| DEAE-Sepharose   | 0.880    | 4.53    | 5.15       |
| Superdex 200     | 0.00288  | 0.262   | 91.1       |

## [實施例4] (R)-2-辛醇脫氫酵素的分子量測定

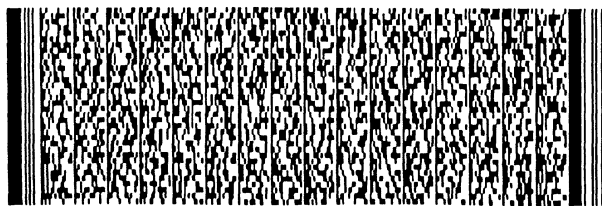
實施例3得到的 *Pichia finlandica* 由來的酵素之次單元的分子量以SDS-PAGE求得結果，約為3.0萬。此外，以Superdex 200膠體過濾的管柱來測定分子量，約為8.3萬。

## [實施例5] (R)-2-辛醇脫氫酵素的最適pH

採用磷酸鉀緩衝液(KPB)、Tris鹽酸緩衝液(Tris-HCl)、甘胺酸緩衝液的pH變化，調查實施例3得到酵素(R)-2-辛醇脫氫酵素的活性。以最大活性當作100時的相對活性表示，結果示於圖1，其結果顯示，反應的最適pH為8.0-11.0。

接著，採用磷酸鉀緩衝液、醋酸鈉緩衝液緩衝液的pH變化，調查實施例3得到酵素4-氯化乙醯乙酸乙酯的還原活性。以最大活性當作100時的相對活性表示，結果示於表圖2，其結果顯示，反應的最適pH為5.0-6.5。

## [實施例6] (R)-2-辛醇脫氫酵素的作用最適溫度



## 五、發明說明 (42)

實施例3得到的酵素在標準反應條件下，只有改變溫度變化測定(R)-2-辛醇氧化活性，以最大活性當作100時的相對活性表示，結果示於圖3，其結果顯示，反應的最適溫度為45-55℃。

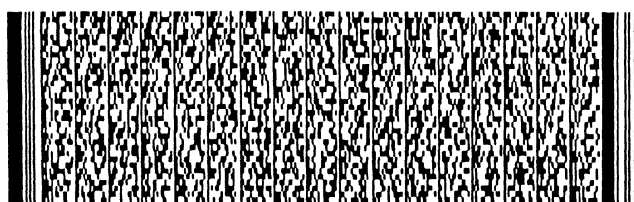
實施例3得到的酵素在標準反應條件下，只有改變溫度變化測定4-氯化乙醯乙酸乙酯還原活性，以最大活性當作100時的相對活性表示，結果示於圖4。其結果顯示，反應的最適溫度為55-60℃。

## [實施例7] (R)-2-辛醇脫氫酵素的pH安定性

實施例3得到的酵素在Pichia finlandica的廣範圍緩衝液pH 3-12中，30℃，30分鐘培養，測定殘存活性。以未處理的活性當做100時的殘存活性表示，結果示於圖5。其結果顯示，本發明中的(R)-2-辛醇脫氫酵素在pH 8.0-9.0中最安定。

## [實施例8] (R)-2-辛醇脫氫酵素的基質特異性

實施例3得到的酵素與種種醇類進行反應，測定其氧化活性。以NAD<sup>+</sup>作為輔酶，以(R)-2-辛醇脫氫酵素的氧化活性當作100時的相對活性表示，結果示於表2。



## 五、發明說明 (43)

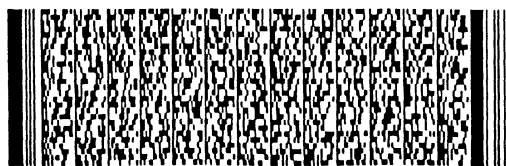
表 2

## 基質(氧化反應)

|                    |       |
|--------------------|-------|
| (R)-2-辛醇           | 100   |
| (S)-2-辛醇           | 4.73  |
| 2-丙醇               | 6.79  |
| 1-辛醇               | 1.72  |
| (R)-4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基 | 0.172 |
| (S)-4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基 | 2.24  |
| (R)-1-苯基乙醇         | 255   |
| (S)-1-苯基乙醇         | 1.81  |
| (R)-3-氫氧基酪酸乙基      | 41.1  |
| (S)-3-氫氧基酪酸乙基      | 1.03  |
| 乙醇                 | 0.688 |
| (R)-2-丁醇           | 49.3  |
| (S)-2-丁醇           | 7.31  |
| 環己醇                | 0.172 |
| (R)-1-苯基-1, 3-丙二醇  | 0.344 |
| (S)-1-苯基-1, 3-丙二醇  | 0.258 |
| 2-己醇               | 54.1  |
| (R)-1, 3-丁二醇       | 1.29  |
| (S)-1, 3-丁二醇       | 0.516 |
| 2-辛醇               | 77.8  |
| 1-苯氧基-2-丙醇         | 15.5  |

其結果顯示，醇作為基質，顯示出對於(S)-2-辛醇為4.7%，對於2-丙醇為6.8%，對於(R)-1-苯基乙醇為255%的相對活性。

實施例3得到的酵素與種種酮類進行反應，測定其還原活性。以NADH作為輔酶，以4-氯化乙醯乙酸乙酯的還原活性當作100時的相對活性表示，結果示於表3。



## 五、發明說明 (44)

表 3

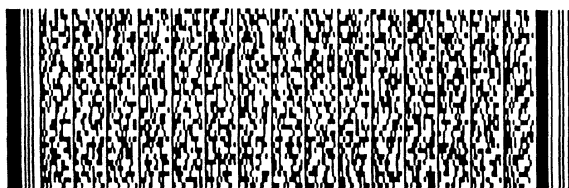
基質(還原反應)

|            |       |
|------------|-------|
| 4-氯化乙醯乙酸乙酯 | 100   |
| 2-辛醇       | 31.2  |
| 乙醯苯酮       | 45.3  |
| 乙醯乙酸乙酯     | 106   |
| 1-苯氧基-2-丙酮 | 54.2  |
| 丙醛         | 18.4  |
| 4-氫氧基-2-丁酮 | 0.691 |
| 丙酮         | 1.82  |
| 2-丁酮       | 7.99  |

其結果顯示，以酮類作為基質時，對於2-辛醇為31.2%，對於乙醯苯酮為45%的相對活性。

[實施例9] (R)-2-辛醇脫氫酵素對於各種試藥的反應

以種種試藥，於30℃，30分鐘處理後，測定(R)-2-辛醇脫氫酵素活性，並以不含試藥條件下處理30℃，30分鐘後的活性當作100時的殘存活性表示，結果示於表4。本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素會被氯化汞、乙二胺四乙酸二鈉鹽稍微阻斷。在N-乙基順丁烯二醯亞胺、鄰-菲繞啉、氯化鎂、氯化鈣、氯化錳下則較安定化。

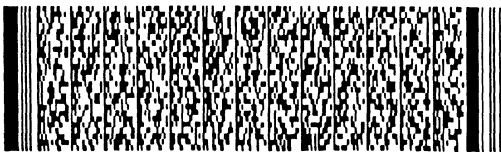


## 五、發明說明 (45)

| 試藥                                    | 濃度(mM) | 殘存活性(%) |
|---------------------------------------|--------|---------|
| 對照組                                   | -      | 100     |
| PMSF                                  | 1      | 111     |
| 側氯化(Parachloro)汞安                     | 0.05   | 118     |
| 息香酸                                   |        |         |
| N-乙基順丁烯二醯亞胺                           | 1      | 147     |
| EDTA·2Na                              | 1      | 81      |
| 鄰-菲繞琳                                 | 1      | 162     |
| 二硫赤蘚醇                                 | 1      | 123     |
| NH <sub>4</sub> OH-HCl                | 0.01   | 99      |
| 櫟精(Guercetin)                         | 0.1    | 99      |
| KCl                                   | 1      | 106     |
| 毫克 Cl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 1      | 185     |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 1      | 174     |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O  | 1      | 185     |
| FeCl <sub>3</sub>                     | 1      | 93      |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O  | 1      | 99      |
| NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O  | 1      | 103     |
| ZnCl <sub>2</sub>                     | 1      | 96      |
| BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 1      | 102     |
| CuSO <sub>4</sub>                     | 1      | 100     |
| HgCl <sub>2</sub>                     | 0.01   | 62      |

## [ 實施例10 ] (R)-2-辛醇脫氫酵素對各種試藥的活性化

測定在種種試藥中(R)-2-辛醇脫氫酵素的活性化效果，以不含試藥之條件下的活性當作100時的相對活性表示，結果示於表5。本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素會被鎂離子、錳離子、亞鉛離子活性化。至於陰離子的影響則顯示會被硫酸離子活性化。



## 五、發明說明 (46)

表 5

| 試藥                                                | 濃度(mM) | 相對活性(%) |
|---------------------------------------------------|--------|---------|
| 對照組                                               | -      | 100     |
| 毫克 $\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$        | 1      | 122     |
| 毫克 $\text{SO}_4$                                  | 1      | 125     |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$         | 1      | 114     |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1      | 121     |
| $\text{ZnCl}_2$                                   | 1      | 105     |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$         | 1      | 110     |

## [實施例11](R)-2-辛醇脫氫酵素的部分胺基酸序列

採用實施例3 得到的酵素，以蛋白質定序儀解析N端胺基酸序列，將N端胺基酸阻斷。接著，將精製的酵素以SDS-PAGE分離後，切出含有(R)-2-辛醇脫氫酵素的膠體，加入含有胰蛋白酶的Tris緩衝液(pH 8.0)，於35℃，進行20小時的處理。之後將試料溶液以逆向HPLC處理，分離斷片胜肽。胜肽斷片以蛋白質定序儀解析胺基酸序列，結果得到3種胺基酸序列。胜肽A、胜肽B、胜肽C的胺基酸序列分別如序列編號：3、序列編號：4、序列編號：5 所示。

序列編號：3：胜肽A

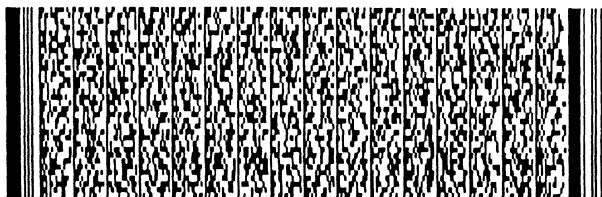
Val-Ala-Val-Val-Thr-Gly-Ala-Leu-Ser-Gly

序列編號：4：胜肽B

Leu-Ile-Ser-Glu-Thr-Leu-Ala-Thr-Phe-Gly-Leu

序列編號：5：胜肽C

Leu-Gly-Arg-Pro-Glu-Glu-Val-Ala-Asp-Ala



## 五、發明說明 (47)

[實施例12] 由 *Pichia finlandica* 進行染色體DNA的調製  
依據 *Pichia finlandica* 之 Cryer 等人的方法 (Meth. Cell Biol. 12, 39-44 (1975))，進行染色體DNA的精製。

[實施例13] (R)-2-辛醇脫氫酵素基因的核心範圍以PCR進行選殖

合成胜肽A對應的正股引子(sense primer)及胜肽C對應的負股引子(antisense primer)。個別引子的起始處組合入BamHI限制酶切位(site)(GTCGGATCC)。鹽基序列分別如序列編號：6(引子A)、7(引子C)所示。

序列編號：6：引子A

GTCGGATCCGTBGCHGTBGTBACHGGHGC

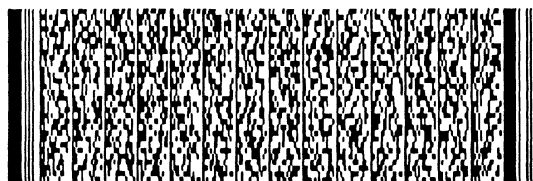
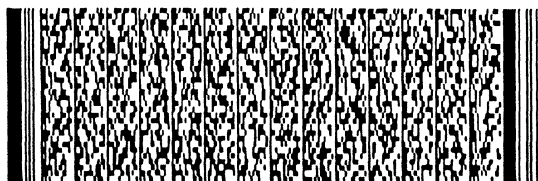
序列編號：7：引子B

GTCGGATCCGCRTCNGCNACYTCYTCNNG

含有引子A、引子C各50 pmol，dNTP 10 nmol，  
*Pichia finlandica* 由來染色體DNA 100 ng，ExTaq用緩衝液(寶酒造製)，ExTaq 2單位(寶酒造製)共50  $\mu$ l的反應液，以變性(94℃、30秒)，連合(37℃、30秒)，伸長(70℃、1分鐘)，共30循環，進行PCR反應，得到特異的增幅產物。

[實施例14] (R)-2-辛醇脫氫酵素基因核心範圍之PCR斷片的次選殖

以PCR增幅得到的個別DNA斷片以苯酚/氯仿抽出後，經酒精沈澱回收後，進行BamHI的限制酶切割。之後再以



## 五、發明說明 (48)

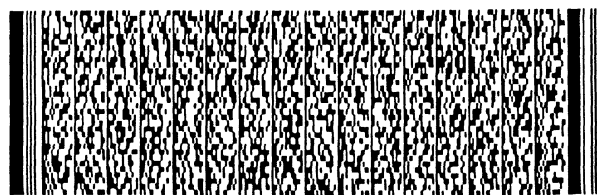
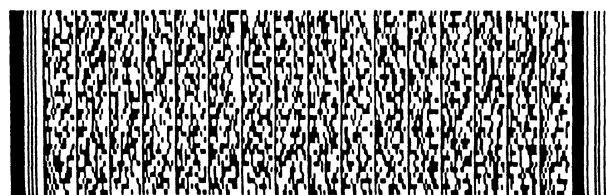
2% 瓊脂糖凝膠進行電泳，切出標的條帶，以Sephaglas (Pharmacia 製)精製，而回收。

得到的個別DNA斷片採用BamHI消化過的pUC18(寶酒造製)及Takara Ligation Kit Ver.2，進行接合反應(ligation)。再轉形至大腸菌(以E. coli簡稱) JM109株。轉形株以含有安比西林(50  $\mu$ g/毫升)，5-溴化-4-氯化-3-吡啶基- $\beta$ -D-半乳糖吡喃苷(50  $\mu$ g/毫升)，異丙基硫- $\beta$ -D-半乳糖吡喃苷(以下以IPTG簡稱)(20  $\mu$ g/毫升)的LB培養盤(1% bacto-tryptone，0.5% bacto extract，1% 氯化鈉，以下以LB培養基簡稱)培養出單一菌落，每個白色菌株再培養於含有安比西林的LB培養液，以Flexi-Prep (Pharmacia 製)精製含有標的DNA斷片的質體。

採用精製的質體，解析插入DNA的鹽基序列。DNA鹽基序列的解析是採用BigDye Ter分鐘ator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystem 製)進行PCR，再以PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem 製)進行解析。決定核心範圍的鹽基序列分別示於序列編號：8：PF-CORE。

[實施例15] (R)-2-辛醇脫氫酵素基因核心範圍之周邊DNA的次選殖

Pichia finlandica的染色體DNA分別經限制酶BstYI、NspI、PstI消化，採用T4接合酶(於16℃隔夜進行自身接合反應，使各斷片環化。接著，以含有起始處組合有BamHI切位(GTCGGATCC)的引子Pf0D-c5u (序列編號：



## 五、發明說明 (49)

9)、PfOD-c3d(序列編號:10)各50 pmol, dNTP 10 nmol, 自身接合的DNA 125 ng, ExTaq用的緩衝液(寶酒造製), ExTaq 1單位(寶酒造製)共50  $\mu$ l的反應液, 以變性(94  $^{\circ}$ C、30秒), 連合(55  $^{\circ}$ C、30秒), 伸長(72  $^{\circ}$ C、1分鐘), 共35循環, 並用GeneAmp PCR System 2400(Perkin Elmer製)進行反應。PCR反應產物的一部份以凝膠電泳解析結果顯示, 以BstYI、NspI、PstI分別消化模板DNA, 對應出約3500bp、2000bp、4000bp的DNA斷片。

序列編號:9: PfOD-c5u

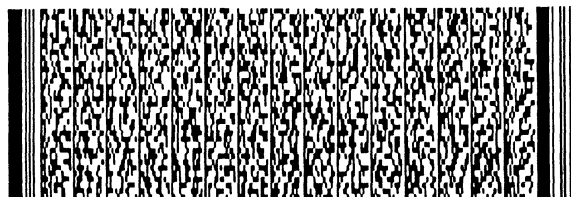
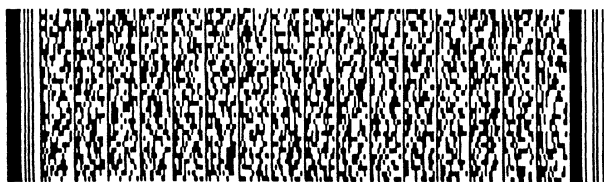
GTCGGATCCTCAGAGATCGTTACTTTGGC

序列編號:10: PfOD-c3d

GTCGGATCCCGACTCCTTTGATAGATGAG

以PCR增幅得到的個別DNA斷片以苯酚/氯仿抽出後, 經酒精沈澱回收後, 再進行BamHI的限制酶消化後, 進行凝膠電泳, 切出標的條帶, 以Sephaglas (Pharmacia製)精製, 而回收。

得到的個別DNA斷片採用BamHI消化過的pUC18(寶酒造製)及Takara Ligation Kit Ver.2, 進行接合反應, 再轉形至大腸菌JM109株。轉形株以含有安比西林(50  $\mu$ g/毫升), 5-溴化-4-氯化-3-吡啶基- $\beta$ -D-半乳糖吡喃苷(50  $\mu$ g/毫升), 異丙基硫- $\beta$ -D-半乳糖吡喃苷(以下以IPTG簡稱)(20  $\mu$ g/毫升)的LB培養盤培養出單一菌落, 每個白色菌株再培養於含有安比西林的LB培養液, 以Flexi-Prep(Pharmacia製)精製質體。得到的質體對



## 五、發明說明 (50)

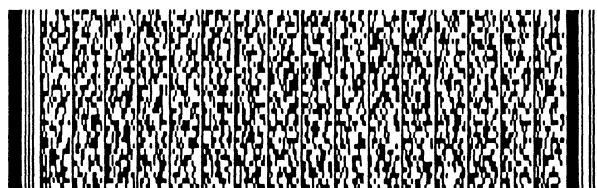
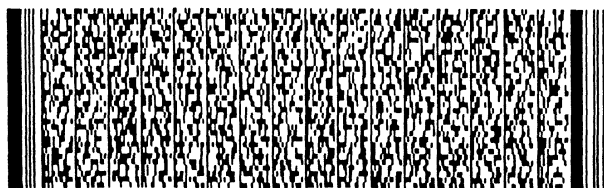
應作為PCR模板的DNA調製用的限制酶BstYI、NspI、PstI，分別得到pPF-Bst、pPF-Nsp、pPF-Pst。

解析由精製質體插入之DNA的鹽基序列。DNA鹽基序列的解析是採用BigDye Ter分鐘ator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystem製)進行PCR，再以PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem製)進行解析。pPF-Bst、pPF-Nsp、pPF-Pst內插入DNA斷片解析其鹽基序列得到以核心範圍5'-上游側(5U)、3'-下游側(3D)來區分，分別顯示PF-5U(序列編號：11)、PF-3D(序列編號：12)。

合成PF-5U、PF-3D、PF-CORE各鹽基序列，以ORF(開放譯讀架構)檢索決定(R)-2-辛醇脫氫酵素基因序列。決定的DNA鹽基序列顯示於序列編號：1，其鹽基序列編碼胺基酸序列顯示於序列編號：2。這些合成、ORF檢索是在Genetyx-ATSQ/WIN、及Genetyx-WIN(都是軟體開發有限公司製)的軟體進行。

## [實施例16](R)-2-辛醇脫氫酵素基因的選殖-1

以(R)-2-辛醇脫氫酵素的構造基因鹽基序列為基礎，利用已發現的載體構築用引子PFO-ATG1(序列編號：13)、PFO-TAA1(序列編號：14)合成。以含有引子各10 pmol，dNTP 10 nmol，Pichia finlandica由來染色體DNA 50 ng，Pfu-DNA聚合酶用的緩衝液(STRATAGENE製)，Pfu-DNA聚合酶1.25單位(STRATAGENE製)共50  $\mu$ l的反應液，以變性(95℃、30秒)，連合(50℃、1分鐘)，伸長(75℃、1



## 五、發明說明 (51)

分30秒)，共30個循環，並用GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer製)進行反應。

序列編號：13：PFO-ATG1

TCGACATGTCTTATAATTTCCATAACAAG

序列編號：14：PFO-TAA1

GCAGAATTCCTCTAGATTACTGGGCTGTGTACCC

PCR反應產物的一部份以凝膠電泳解析結果，可以檢出特異的條帶。

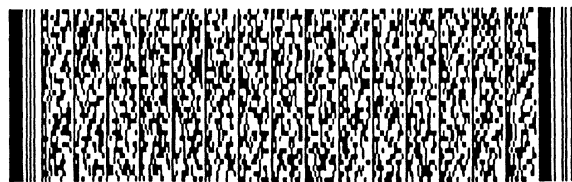
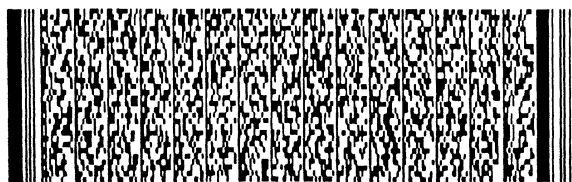
得到的DNA斷片以苯酚/氯仿抽出後，經酒精沈澱回收。DNA斷片以限制酶AflIII、EcoRI二重消化，進行凝膠電泳，切出標的條帶的部份，以Sephaglas (Pharmacia製)精製。

得到的DNA斷片採用AflIII、EcoRI二重消化過的pSE420D (Invitrogen製質體載體pSE240的多選殖位 (multiple cloning site)改變過的質體，特開2000-189170)及Takara Ligation Kit，進行接合反應，再轉形至大腸菌JM109株。

轉形株以含有安比西林(50  $\mu$ g/毫升)的LB培養盤培養，將每個菌株精製質體後，解析插入斷片的鹽基序列。稱具有標的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的質體為pSE-PF01，質體構築過程示於圖6。

[實施例17] (R)-2-辛醇脫氫酵素基因的選殖-2

以(R)-2-辛醇脫氫酵素的構造基因鹽基序列為基礎，利用已發現的載體構築用引子PFO-ATG2(序列編號：15)、



## 五、發明說明 (52)

PFO-TAA2(序列編號:16)合成。以含有引子各10 pmol, dNTP 10 nmol, *Pichia finlandica* 由來染色體DNA 50 ng, Pfu-DNA 聚合酶用的緩衝液(STRATAGENE製), Pfu-DNA 聚合酶1.25單位(STRATAGENE製)共50  $\mu$ l的反應液,以變性(95 °C、30秒),連合(50 °C、1分鐘),伸長(75 °C、1分30秒),共30個循環,並用GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer製)進行反應。

序列編號:15:PFO-ATG2

CACGAATTCTAAAATGTCTTATAATTTCCATAACAAG

序列編號:16:PFO-TAA2

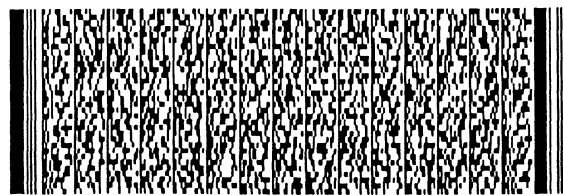
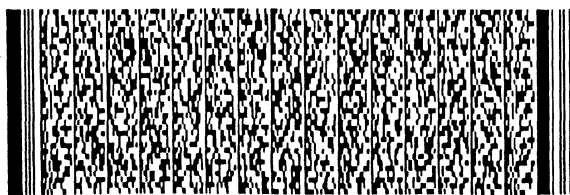
AGTACTAGTATTACTGGGCTGTGTACCC

PCR反應產物的一部份以凝膠電泳解析結果,可以檢出特異的條帶。

得到的DNA斷片以苯酚/氯仿抽出後,經酒精沈澱回收。DNA斷片以限制酶EcoRI、SpeI二重消化,進行凝膠電泳,切出標的條帶的部份,以Sephaglas (Pharmacia製)精製。

得到的DNA斷片採用EcoRI、SpeI二重消化過的pSE420D及Takara Ligation Kit,進行接合反應,再轉形至大腸菌JM109株。

轉形株以含有安比西林(50  $\mu$ g/毫升)的LB培養盤培養,將每個菌株精製質體後,解析插入斷片的鹽基序列。稱具有標的(R)-2-辛醇脫氫醇素基因的質體為pSE-PF02,質體構築過程示於圖7。



## 五、發明說明 (53)

## [實施例18] 重組(R)-2-辛醇脫氫酵素之大腸菌的生產

以(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的表現質體pSE-PF01、pSE-PF02轉形的大腸菌JM109株在含有安比西林的LB培養液於30℃隔夜培養，加入0.1 mM IPTG (異丙基硫半乳糖吡喃苷)，再進行4小時的培養。

菌體以離心分離集菌後，以含有0.02% 2-巰基乙醇、1 mM 硫酸鎂的100 mM Tris/HCl緩衝液(pH 8.5)懸濁，用密閉式超音波破碎裝置UCD-200TM (Cosmo-bio製)處理4分鐘，將菌體破碎。菌體破碎液經離心分離，其上清為菌體抽出液而回收。

## [實施例19] 重組(R)-2-辛醇脫氫酵素的活性

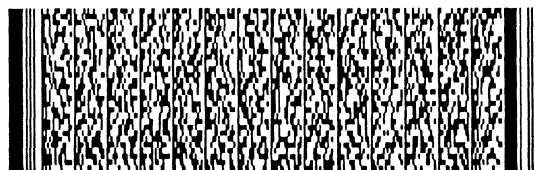
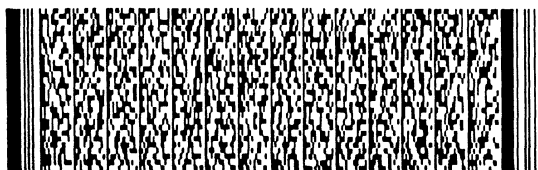
採用實施例18所調製的重組(R)-2-辛醇脫氫酵素對照(R)-2-辛醇測定活性，與在不含有質體的狀態下調製的無細胞抽出液比較活性。其結果整理於表6。

表6

| 質體       | (R)-2-辛醇脫氫酵素活性單位/毫克-蛋白質 |
|----------|-------------------------|
| 無        | 0.00                    |
| pSE-PF01 | 4.16                    |
| pSE-PF02 | 1.95                    |

## [實施例20] 重組(R)-2-辛醇脫氫酵素以各種大腸菌株生產

以Pichia finlandica 由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素之表現質體pSE-PF01轉形至大腸菌HB101株、TG1株(E. coli



## 五、發明說明 (54)

DSM 6056)、毫克1665株(E coli ATCC 47076)。

個別的重組大腸菌在LB培養液種菌，於30℃隔夜培養後，添加IPTG 0.1 mM，再培養4小時。得到的2種大腸菌分別集菌後，測定酵素活性。

[實施例21] 以pSE-PF01轉形之各種大腸菌的酵素活性

根據實施例20，轉形的大腸菌（培養液約為2毫升）以實施例18所記載的方法將菌體破碎，菌體抽出調製後，取來測定酵素活性。個別的酵素活性值列示於表7。

表7

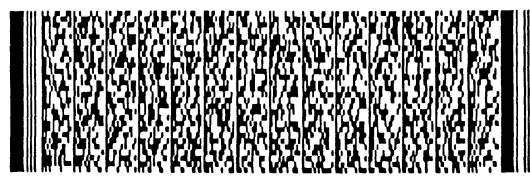
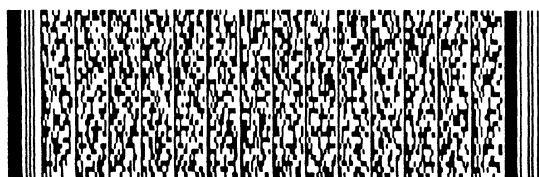
| 宿主      | (R)-2-辛醇脫氫酵素活性單位/毫克-蛋白質 |
|---------|-------------------------|
| JM109   | 4.16                    |
| HB101   | 8.00                    |
| TG1     | 11.0                    |
| 毫克 1655 | 10.4                    |

[實施例22] 枯草桿菌由來的DNA精製

枯草桿菌(*Bacillus subtilis* BGSC 1A1株)於LB培養基培養，調製菌體。菌體由來的染色體DNA精製是採用Qiagen Genomic Tip (Qiagen公司製)，以其所附手冊記載的方法進行精製。

[實施例23] 枯草桿菌由來葡萄糖脫氫酵素基因的選殖

為了還原型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的再生進行，進行文獻中(特開2000-289170)記載的枯草桿菌由來葡萄糖脫氫酵素基因選殖。依據文獻記載的方法，得到pSE-



## 五、發明說明 (55)

BSG1。為構築新質體，合成以構造基因之5'-端、3'-端序列為源的引子BSG-ATG3（序列編號：17）、BSG-TAA3（序列編號：18）。以pSE-BSG1作為模板，進行PCR（95℃、30秒，50℃、1分鐘，75℃、3分15秒）共30循環，得到特異的增幅DNA。

序列編號：17：BSG-ATG3

AGACCATGGATCCAATGTATCCAGATTTTAAAAGGAA

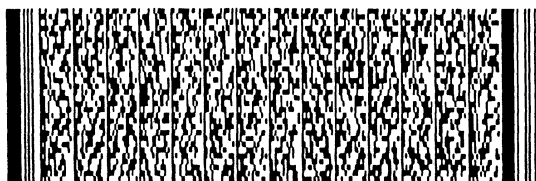
序列編號：18：BSG-TAA3

GAATCTAGATTAAACCGCGGCCTGCCTG

得到的DNA斷片以NcoI和XbaI這2種限制酶進行二重消化。質體載體pSE420D經NcoI和XbaI二重消化後，與同樣酵素二重消化過的PCR增幅DNA斷片以T4 DNA連合酶連結，得到pSE-BSG3。質體構築過程列示於圖8。

[實施例24] Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素與枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素基因共同表現質體pSG-PF01的構築

將實施例15所構築的pSE-PF01以MluI、EcoRI這2個限制酶二重消化，調製含有Pichia finlandica由來(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的DNA斷片。將實施例23所構築之含有枯草桿菌由來葡萄糖脫氫酵素基因的質體pSE-BSG1以MluI、EcoRI這2個限制酶二重消化，調製出含有枯草桿菌由來葡萄糖脫氫酵素基因的DNA斷片，與pSE-PF01同樣酵素切出的含有Pichia finlandica由來(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的DNA斷片經T4連合酶連結，得到同時具有葡萄糖脫氫



## 五、發明說明 (56)

酵素與(R)-2-辛醇脫氫酵素的質體pSG-PF01。質體構築過程列示於圖9。

[實施例25] Pichia finlandica 由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素與枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素基因共同組成之表現質體pSG-PF02的構築

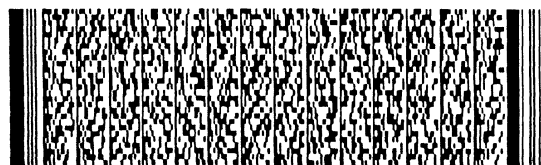
將實施例16所構築的pSE-PF02以EcoRI、SpeI這2個限制酶二重消化，調製含有Pichia finlandica 由來(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的DNA斷片。

將實施例23所構築之含有枯草桿菌由來葡萄糖脫氫酵素基因的質體pSE-BSG2以EcoRI、SpeI這2個限制酶二重消化，與pSE-PF02以同樣酵素切出的含有Pichia finlandica 由來(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的DNA斷片經T4連合酶連結，得到同時具有葡萄糖脫氫酵素與(R)-2-辛醇脫氫酵素的質體pSG-PF01。質體構築過程列示於圖10。

[實施例26] 同時研發枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素與Pichia finlandica 由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素之大腸菌以同時含有枯草桿菌由來的葡萄糖脫氫酵素與Pichia finlandica 由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素的質體pSG-PF01、pSG-PF02轉形至大腸菌JM109株。

分別將重組大腸菌種菌於LB培養液，於30℃隔夜培養後，添加IPTG 0.1 mM，再培養4小時。將得到的2種大腸菌分別集菌，測定酵素活性。

[實施例27] 以pSG-PF01、pSG-PF02轉形之大腸菌的酵素活性



## 五、發明說明 (57)

依照實施例26而轉形的大腸菌(培養液約有2 毫升)，以實施例17所記載的方法將菌體破碎，調製菌體抽出液，作為酵素活性的測定之用。葡萄糖脫氫酵素活性的測定是在含有100 mM磷酸鉀緩衝液(pH6.5)、2.5 mM NAD<sup>+</sup>、100 mM D-葡萄糖及酵素的反應液中，於30℃下進行。1單位是代表上述反應條件下，1分鐘內使1  $\mu$ mol之NADH生成之觸媒的酵素量。個別的活性值列示於表8。

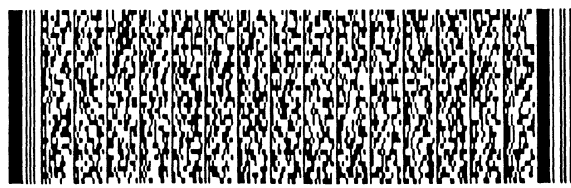
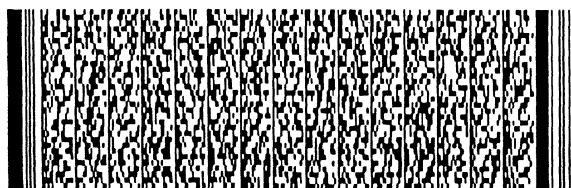
表8

| 質體       | (R)-2-辛醇脫氫酵素活性<br>單位/毫克-蛋白質 | 葡萄糖脫氫酵素活性<br>單位/毫克-蛋白質 |
|----------|-----------------------------|------------------------|
| pSG-PF01 | 5.64                        | 0.14                   |
| pSG-PF02 | 8.80                        | 0.15                   |

[實施例28] Mycobacterium vaccae 由來甲酸脫氫酵素的次選殖

為了還原型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的再生進行，採用文獻中(Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 479-483(1995))記載之以Mycobacterium vaccae由來甲酸脫氫酵素基因進行甲酸脫氫酵素的選殖。

以文獻記載的序列為源，為了構築只有甲酸脫氫酵素開放讀碼區部份的選殖，合成以構造基因之5'-端、3'-端序列為源的引子MCF-ATG2 (序列編號：19)、MCF-TAA3 (序列編號：20)。以質體pSFR415(寄存編號CCRC940338中華民國食品工業發展研究所菌種中心)作為模板，進行PCR



## 五、發明說明 (58)

(95 °C、45 秒，50 °C、1 分鐘，75 °C、7 分鐘)共30循環，得到特異的增幅DNA。得到的DNA斷片以NcoI和XbaI這2種限制酶進行二重消化。質體載體pSE420D經NcoI和XbaI二重消化後，與同樣酵素二重消化過的PCR增幅DNA斷片以T4 DNA連合酶連結，得到pSE-MCF15。質體構築過程列示於圖11。

進行插入DNA斷片的鹽基序列解析的結果顯示，其編碼蛋白質與文獻記載的胺基酸序列一致。

序列編號：19：MCF-ATG2

CTTTCTAGAGGAATTCAACCATGGCAAAAGTTCTGTGTGTTT

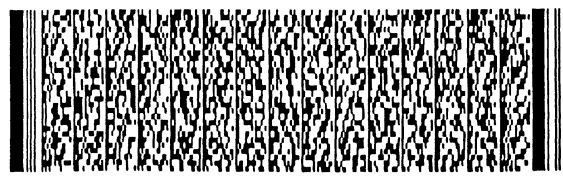
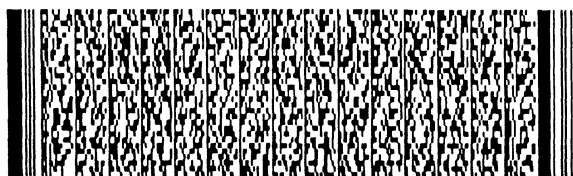
序列編號：20：MCF-TAA3

CAGTCTAGATTAGACCGCTTTTTTTGAATTTGGCG

[實施例29] Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素與Mycobacterium vaccae由來甲酸脫氫酵素基因共同表現質體pSF-PF02的構築

將實施例16精製的pSE-PF02以EcoRI、SpeI這2個限制酶二重消化，調製含有Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的DNA斷片。

將實施例28所構築的質體pSE-MCF15以EcoRI、SpeI這2個限制酶二重消化，調製含有Mycobacterium vaccae由來甲酸脫氫酵素基因的DNA斷片，與pSE-PF01同樣酵素切出的含有Pichia finlandica由來(R)-2-辛醇脫氫酵素基因的DNA斷片經T4連合酶連結，得到同時具有甲酸脫氫酵素與(R)-2-辛醇脫氫酵素的質體pSF-PF02。質體構築過程列



## 五、發明說明 (59)

示於圖12。

[實施例30] 同時研發Pichia finlandica由來(R)-2-辛醇脫氫酵素與Mycobacterium vaccae由來甲酸脫氫酵素之大腸菌

以同時含有Mycobacterium vaccae由來甲酸脫氫酵素與Pichia finlandica由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素的質體pSF-PF02轉形至大腸菌JM109株。

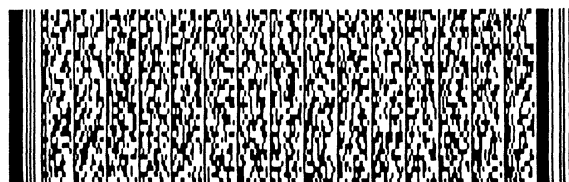
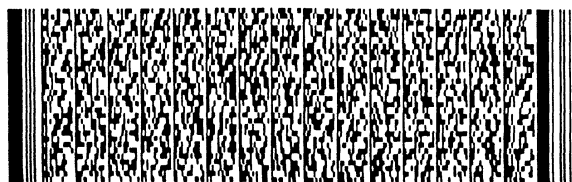
分別將重組大腸菌種菌於LB培養液，於30℃隔夜培養後，添加IPTG 0.1mM，再培養4小時。將得到的大腸菌集菌，測定酵素活性。

[實施例31] 以pSF-PF02轉形之大腸菌的酵素活性

以實施例30調製之pSF-PF02轉形的大腸菌(培養液約有2毫升)，以實施例17所記載的方法將菌體破碎，調製菌體抽出液，作為酵素活性的測定之用。甲酸脫氫酵素活性的測定是在含有100 mM磷酸鉀緩衝液(pH6.5)、2.5 mM NAD<sup>+</sup>、100mM甲酸及酵素的反應液中，於30℃下進行。1單位是代表上述反應條件下，1分鐘內使1  $\mu$ mol之NADH生成之觸媒的酵素量。由重組大腸菌得到粗酵素液的酵素活性，在(R)-2-辛醇脫氫酵素活性為8.99單位/毫克-蛋白質，在甲酸脫氫酵素活性為0.653單位/毫克-蛋白質。

[實施例32] 以Pichia finlandica由來(R)-2-辛醇脫氫酵素進行(S)-4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基的合成

在含有100mM磷酸鉀緩衝液(pH 6.5)、139.8 毫克 NADH、實施例3所得到的Pichia finlandica由來(R)-2-辛



## 五、發明說明 (60)

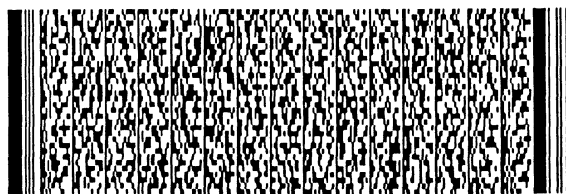
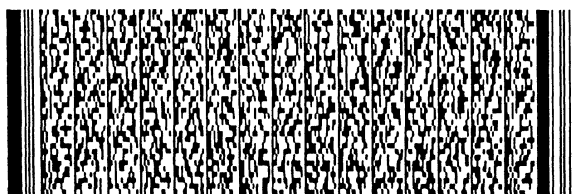
醇脫氫酵素 1.75 單位、0.5% 4-氯化乙醯乙酸乙酯的反應液中，於30℃隔夜反應。生成之4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基的光學純度以下述的方式求得。由反應液抽出4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基，脫去溶劑後，採用光學分離的液體色層分析法分析。光學分離管柱是採用化學工業有限公司製的 CHIRALCEL OD (CHIRALCEL OD. 4.6 mm x 25 cm)，以正-己烷：2-丙醇=93:7溶離液，流速為1毫升/分鐘，進行RI的檢出。其結果顯示，本發明所生成的4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基是具有99%ee以上的S體。

[實施例33] 以 Pichia finlandica 由來(R)-2-辛醇脫氫酵素進行2, 3-二氟-6-硝基[[ (R)-2-氫氧基丙基]氧基]苯的合成

在含有200mM磷酸鉀緩衝液(pH6.5)、86 mM葡萄糖、1 mM NAD<sup>+</sup>、1 mM硫酸鎂、實施例3所得到的Pichia finlandica由來(R)-2-辛醇脫氫酵素1單位、葡萄糖脫氫酵素2單位的1毫升反應液中，添加含有1% 2-丙酮基氧基-3, 4-二氟硝基苯的1毫升甲苯，攪拌下於25℃反應15小時。

反應終了液分析的結果顯示，生成2, 3-二氟-6-硝基[[ (R)-2-氫氧基丙基]氧基]苯1.0克/升，其光學純度約為100%。

生成物2, 3-二氟-6-硝基[[ (R)-2-氫氧基丙基]氧基]苯的定量是以含有液相及有機相的生成物經逆向HPLC分析(管柱：Inertsil-ODS-2 (0.46 x 15cm, G-L有限公司)；



## 五、發明說明 (61)

溶離液：水/乙腈(acetonitrile)=1:1；流速：0.5毫升/分鐘；管柱溫度：室溫；檢出：260 nm的UV)而進行。

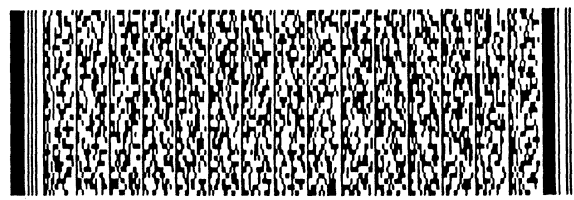
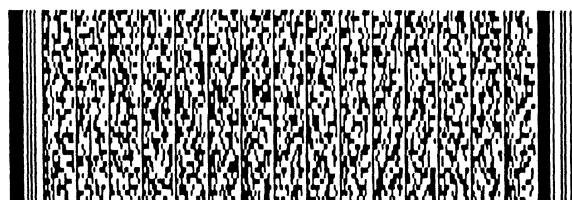
更進一步，生成物2，3-二氟-6-硝基[[*(R)*-2-氫氧基丙基]氧基]苯光學純度的測定是採用光學分離管柱HPLC分析(管柱：CHIRALPAK AD. (4.6 mm x 25 cm、化學工業有限公司)；溶離液：己烷/2-丙醇=9/1；管柱溫度：40℃；流速：1毫升/分鐘；檢出：260 nm的UV吸收波長)進行。

[實施例34]利用pSF-PF02進行2，3-二氟-6-硝基[[*(R)*-2-氫氧基丙基]氧基]苯的合成

將依實施例30調製而得的pSF-PF02轉形大腸菌(培養液約為5毫升)集菌，於含有500 mM HEPES/NaOH緩衝液(pH 6.5)、829 mM 甲酸鈉、1 mM 硫酸鎂的5.22毫升反應液中，添加2-丙酮基氧基-3，4-二氟硝基苯 500毫克，攪拌下於30℃反應18小時。

反應終了液的分析結果顯示，2，3-二氟-6-硝基[[*(R)*-2-氫氧基丙基]氧基]苯生成486毫克，其光學純度約為100%。

生成物2，3-二氟-6-硝基[[*(R)*-2-氫氧基丙基]氧基]苯的定量是將反應液加入甲苯而抽出生成物，含有液相及有機相的生成物以氣相色層分析法定量，求得相對於原料的回收率。氣相色層分析法的條件是按照以下所述。也就是以矽OV-210 20% Chromosorb W(AW-DMCS) 60/80 mesh (G-L公司)，3.2 mm x 200 cm，管柱溫度為170℃，利用氫離子化檢出器(FID)而檢出。



## 五、發明說明 (62)

更進一步，生成物2, 3-二氟-6-硝基[[*(R)*-2-氫氧基丙基]氧基]苯的光學純度測定是採用光學分離管柱HPLC分析(管柱:CHIRALPAK AD.(4.6 mm x 25 cm、化學工業有限公司);溶離液:己烷/乙醇=9/1;管柱溫度:40℃;流速:1毫升/分鐘;檢出:260nm的UV吸收波長)進行。

[實施例35] Candida utilis 由來之(*R*)-2-辛醇脫氫酵素的精製

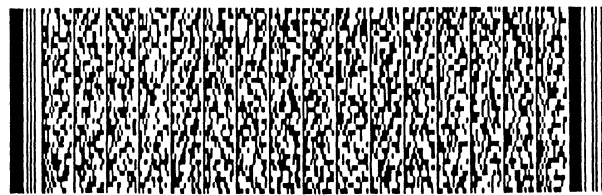
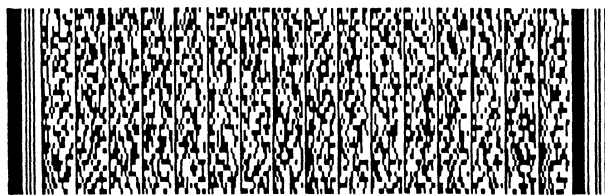
將Candida utilis IFO 0988株於3.6L的培養基B培養，離心分離調製菌體。得到的溼菌體以100mM磷酸鉀緩衝液(pH 8.0)、10%甘油、1mM乙二胺四乙酸二鈉鹽、0.01% 2-巰基乙醇及2mM吩嗪甲硫酸氯沈澱懸浮，再以BEAD-BEATER (Biospec公司製)破碎菌體，以離心分離除去菌體殘渣，得到無細胞抽出液。此無細胞抽出液添加魚精蛋白硫酸，經離心分離除去核酸得到上清。此上清液再加入硫化胺至30%飽和後以離心分離得到含粗酵素液的上清。此酵素液以含有30%飽和硫化胺的標準緩衝液透析後，以同緩衝液添加於平衡化的苯基-瓊脂糖HP (2.6 cm x 10 cm)，以硫化胺濃度30%-0%漸漸加入進行濃度的分離。溶出的各管部份中，選擇性回收具有(*R*)-2-辛醇的收集管，以限外濾過濃縮。所採用的培養基B組成是按照下述成份。

- 培養基B

酵母精粹物10克/升

蛋白胨 20克/升

甲醇 1%



## 五、發明說明 (63)

PH 6.0

濃縮的酵素液經標準緩衝液透析後，以同緩衝液添加於平衡化的藍-瓊脂糖HP (1.6 cm x 2.5 cm)，以同緩衝液洗淨後，依0-1.5 M氯化鈉的濃度進行分管收集。

(R)-2-辛醇脫氫酵素的活性是以單純通過溶出部份溶出，回收此部份的液體，濃縮之。以標準緩衝液添加於平衡化的Mono Q HR 5/5 (0.5 cm x 5 cm)，以同緩衝液洗淨後，依0-1 M氯化鈉的濃度進行分管收集。(R)-2-辛醇脫氫酵素的活性是以分層溶出部份溶出，回收此部份的液體。濃縮之。濃縮的酵素液採用Superdex 200 (0.32 cm x 30 cm)，以含有0.3M氯化鈉的標準緩衝液進行濾過。

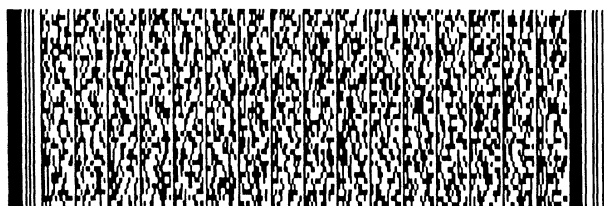
收集以膠體濾過得到的活性部份，即得到精製酵素。

精製酵素的活性比測定結果顯示，(R)-2-辛醇的氧化活性約為3.33U/毫克。精製的簡述列於表9。

表9

| 步驟               | 蛋白質量(毫克) | 總活性(單位) | 比活性(單位/毫克) |
|------------------|----------|---------|------------|
| 無細胞抽出液           | 1,220    | 6.58    | 0.00539    |
| 除核酸              | 396      | 2.30    | 0.00581    |
| 硫化胺 30%          | 471      | 1.14    | 0.00242    |
| Phenyl-Sepharose | 17.7     | 0.757   | 0.0429     |
| Blue-Sepharose   | 10.2     | 0.745   | 0.0727     |
| MonoQ            | 0.776    | 0.386   | 0.497      |
| Superdex 200     | 0.0131   | 0.0434  | 3.33       |

[實施例36](R)-2-辛醇脫氫酵素的分子量測定



## 五、發明說明 (64)

實施例3得到的Candida utilis由來酵素的分子量以 Superdex G200 的膠體濾過測定時，約為15萬。

## [實施例37] (R)-2-辛醇脫氫酵素的最適pH值

以Tris鹽酸緩衝液(Tris-HCl)、甘胺酸緩衝液改變pH值，調查實施例35得到的酵素(R)-2-辛醇脫氫酵素活性，以最大活性當作100時的相對活性表示，結果示於圖13。其結果顯示，反應的最適pH為8.5-10.0。

採用磷酸鉀緩衝液、醋酸鈉緩衝液改變pH值，調查實施例35得到的酵素4-氯化乙醯乙酸乙酯還原活性，以最大活性當作100時的相對活性表示，結果示於圖14。其結果顯示，反應的最適pH為5.0-6.5。

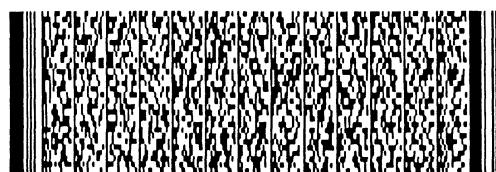
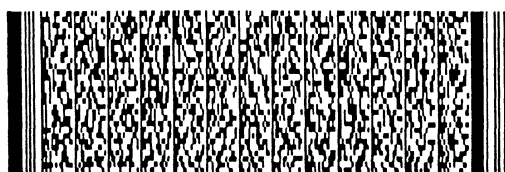
## [實施例38] (R)-2-辛醇脫氫酵素的基質特異性

實施例35得到的酵素與種種醇類反應，測定其氧化活性。其結果顯示，以NAD<sup>+</sup>作為輔酶時，以(R)-辛醇的氧化活性當作100表示其相對活性，結果示於表10。其結果顯示，以醇作為基質時，對於(S)-2-辛醇為6.7%、對於2-丙醇為8.3%、對於(R)-1-苯基乙醇為86.7%的相對活性。

表 10

基質(氧化反應)

|            |      |
|------------|------|
| (R)-2-辛醇   | 100  |
| (S)-2-辛醇   | 6.7  |
| 2-丙醇       | 8.3  |
| (R)-1-苯基乙醇 | 86.7 |
| (S)-1-苯基乙醇 | 6.7  |



## 五、發明說明 (65)

實施例35得到的酵素與種種酮類進行反應，測定其還原活性。結果顯示，以NADH作為輔酶時，以4-氯化乙醯乙酸乙酯的還原活性當作100表示相對活性，結果示於表11。其結果顯示，以酮作為基質時，對於2-辛醇為26.6%、對於乙醯苯酮為25.3%的相對活性。

表 11

基質(還原反應)

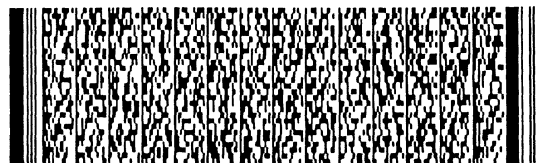
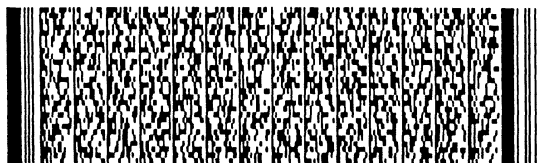
|            |      |
|------------|------|
| 4-氯化乙醯乙酸乙酯 | 100  |
| 2-辛醇       | 26.6 |
| 乙醯苯酮       | 25.3 |

[實施例39] 以 Candida utilis 由來的(R)-2-辛醇脫氫酵素進行(S)-4-氯-3-氫氧基酪酸乙基的合成

以含有100 mM磷酸鉀緩衝液(pH 6.5)、139.8毫克NADH、Candida utilis由來之(R)-2-辛醇脫氫酵素0.06單位、0.5% 4-氯化乙醯乙酸乙酯的反應液中，於30℃隔夜反應。生成之4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基的光學純度以與實施例32同樣方法求得。其結果顯示，以本發明方法生成的4-氯化-3-氫氧基酪酸乙基有97%ee以上為S體。

產業上利用的可能

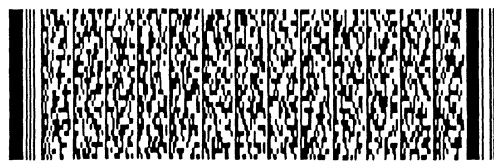
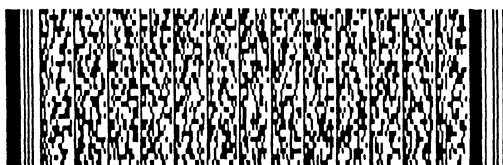
本發明是提供在工業生產較有利的NADH依存性(R)-2-辛醇脫氫酵素。利用本酵素，以光學純度高的(S)-4-鹵化



## 五、發明說明 (66)

-3- 氫氧基酪酸酯為始，可以有效率的生產光學活性醇。特別是以4- 鹵化乙酸酯作為基質，再基於本發明之酵素反應得到的(S)-4- 鹵化-3- 氫氧基酪酸酯，是HMG-CoA 還原酶阻斷劑及D- 藤黃皮素(D-garcinin) 等的醫農藥合成反應中間產物，所以本發明在產業上非常有用。

其中還有，特開平02-732 記載的(R)- 丙氧基苯衍生物是作為合成抗菌劑的光學活性體((S)-(-)-9- 氟化-3- 甲基-10-(4- 甲基-1- 派啶基)-7- 氧-2, 3- 二氫基-7H- 吡啶[1, 2, 3-de][1, 4] 苯氧基-6- 羧酸，特開平62-252790) 等有用的中間產物。歐福洛沙素確定是特定之光學異性體中具有高抗菌活性。可以得到歐福洛沙素高光學純度之合成中間產物的本發明對歐福洛沙素光學異性體的合成具有貢獻。



## 五、發明說明 (67)

## 序列表

&lt;110&gt; DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> (R)-2-Octanol dehydrogenase, method for producing same,  
DNA encoding same, and method for manufacturing alcohols using same.

&lt;130&gt; D1-A0001Y1P

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 2000-43506

&lt;151&gt; 2000-02-16

&lt;150&gt; JP 2000-374593

&lt;151&gt; 2000-12-08

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 765

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pichia finlandica

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(765)

&lt;400&gt; 1

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| atg tct tat aac ttc cat aac aag gtt gca gtt gtt act gga gct cta | 48 |
| Met Ser Tyr Asn Phe His Asn Lys Val Ala Val Val Thr Gly Ala Leu |    |
| 1 5 10 15                                                       |    |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| tca gga atc ggc tta agc gtc gca aaa aag ttc ctt cag ctc ggc gcc | 96 |
| Ser Gly Ile Gly Leu Ser Val Ala Lys Lys Phe Leu Gln Leu Gly Ala |    |
| 20 25 30                                                        |    |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| aaa gta acg atc tct gat gtc agt gga gag aaa aaa tat cac gag act | 144 |
| Lys Val Thr Ile Ser Asp Val Ser Gly Glu Lys Lys Tyr His Glu Thr |     |
| 35 40 45                                                        |     |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gtt gtt gct ctg aaa gcc caa aat ctc aac act gac aac ctc cat tat | 192 |
| Val Val Ala Leu Lys Ala Gln Asn Leu Asn Thr Asp Asn Leu His Tyr |     |
| 50 55 60                                                        |     |



## 五、發明說明 (68)

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| gta cag gca gat tcc agc aaa gaa gaa gat aac aag aaa ttg att tcg<br>Val Gln Ala Asp Ser Ser Lys Glu Glu Asp Asn Lys Lys Leu Ile Ser<br>65 70 75 80     | 240 |
| gaa act ctg gca acc ttt ggg ggc ctg gat att gtt tgt gct aat gca<br>Glu Thr Leu Ala Thr Phe Gly Gly Leu Asp Ile Val Cys Ala Asn Ala<br>85 90 95        | 288 |
| gga att gga aag ttc gct ccc acc cat gaa aca ccc ttc gac gta tgg<br>Gly Ile Gly Lys Phe Ala Pro Thr His Glu Thr Pro Phe Asp Val Trp<br>100 105 110     | 336 |
| aag aag gtg att gct gtg aat ttg aat gga gta ttc tta ctg gat aag<br>Lys Lys Val Ile Ala Val Asn Leu Asn Gly Val Phe Leu Leu Asp Lys<br>115 120 125     | 384 |
| cta gcc atc aat tac tgg cta gag aaa agc aaa ccc ggc gta att gtc<br>Leu Ala Ile Asn Tyr Trp Leu Glu Lys Ser Lys Pro Gly Val Ile Val<br>130 135 140     | 432 |
| aac atg gga tca gtc cac tct ttt gta gca gct cct ggc ctt gcg cat<br>Asn Met Gly Ser Val His Ser Phe Val Ala Ala Pro Gly Leu Ala His<br>145 150 155 160 | 480 |
| tat gga gct gca aaa ggc ggt gtc aaa ctg tta aca caa aca ttg gct<br>Tyr Gly Ala Ala Lys Gly Gly Val Lys Leu Leu Thr Gln Thr Leu Ala<br>165 170 175     | 528 |
| cta gag tac gca tct cat ggt att aga gta aat tct gtc aat ccg ggg<br>Leu Glu Tyr Ala Ser His Gly Ile Arg Val Asn Ser Val Asn Pro Gly<br>180 185 190     | 576 |
| tac att tcg act cct ttg ata gat gag gtt ccg aaa gag cgg ttg gat<br>Tyr Ile Ser Thr Pro Leu Ile Asp Glu Val Pro Lys Glu Arg Leu Asp<br>195 200 205     | 624 |
| aaa ctt gta agc ttg cac cct att ggg aga cta ggt cgt cca gag gaa<br>Lys Leu Val Ser Leu His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Arg Pro Glu Glu<br>210 215 220     | 672 |
| gtt gct gat gca gtc gca ttt ctg tgt tcc cag gag gcc act ttc atc<br>Val Ala Asp Ala Val Ala Phe Leu Cys Ser Gln Glu Ala Thr Phe Ile<br>225 230 235 240 | 720 |
| aac ggc gtt tct ttg ccg gtt gac ggg ggg tac aca gcc cag taa<br>Asn Gly Val Ser Leu Pro Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln<br>245 250 255                 | 765 |

## 五、發明說明 (69)

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 254

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pichia finlandica*

&lt;400&gt; 2

```

Met Ser Tyr Asn Phe His Asn Lys Val Ala Val Val Thr Gly Ala Leu
 1           5           10           15
Ser Gly Ile Gly Leu Ser Val Ala Lys Lys Phe Leu Gln Leu Gly Ala
          20           25           30
Lys Val Thr Ile Ser Asp Val Ser Gly Glu Lys Lys Tyr His Glu Thr
          35           40           45
Val Val Ala Leu Lys Ala Gln Asn Leu Asn Thr Asp Asn Leu His Tyr
          50           55           60
Val Gln Ala Asp Ser Ser Lys Glu Glu Asp Asn Lys Lys Leu Ile Ser
          65           70           75           80
Glu Thr Leu Ala Thr Phe Gly Gly Leu Asp Ile Val Cys Ala Asn Ala
          85           90           95
Gly Ile Gly Lys Phe Ala Pro Thr His Glu Thr Pro Phe Asp Val Trp
          100          105          110
Lys Lys Val Ile Ala Val Asn Leu Asn Gly Val Phe Leu Leu Asp Lys
          115          120          125
Leu Ala Ile Asn Tyr Trp Leu Glu Lys Ser Lys Pro Gly Val Ile Val
          130          135          140
Asn Met Gly Ser Val His Ser Phe Val Ala Ala Pro Gly Leu Ala His
          145          150          155          160
Tyr Gly Ala Ala Lys Gly Gly Val Lys Leu Leu Thr Gln Thr Leu Ala
          165          170          175
Leu Glu Tyr Ala Ser His Gly Ile Arg Val Asn Ser Val Asn Pro Gly
          180          185          190
Tyr Ile Ser Thr Pro Leu Ile Asp Glu Val Pro Lys Glu Arg Leu Asp
          195          200          205
Lys Leu Val Ser Leu His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Arg Pro Glu Glu
          210          215          220
Val Ala Asp Ala Val Ala Phe Leu Cys Ser Gln Glu Ala Thr Phe Ile
          225          230          235          240
Asn Gly Val Ser Leu Pro Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
          245          250

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pichia finlandica*

&lt;400&gt; 3

Val Ala Val Val Thr Gly Ala Leu Ser Gly

## 五、發明說明 (70)

1

5

10

<210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Pichia finlandica

<400> 4  
Leu Ile Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Gly Gly Leu  
1 5 10

<210> 5  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Pichia finlandica

<400> 5  
Leu Gly Arg Pro Glu Glu Val Ala Asp Ala  
1 5 10

<210> 6  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(9)  
<223> BamHI site

<220>  
<221>  
<222> (12)  
<223> B: c or g or t; not a

<220>  
<221>  
<222> (15)  
<223> H: a or c or t; not g

<220>

## 五、發明說明 (71)

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (18)

&lt;223&gt; B: c or g or t; not a

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (21)

&lt;223&gt; B: c or g or t; not a

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (24)

&lt;223&gt; H: a or c or t; not g

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (27)

&lt;223&gt; H: a or c or t; not g

&lt;400&gt; 6

gtcggatccg tbgchgtbgt bachgghgc

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; BamHI site

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (12)

&lt;223&gt; R: a or g

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (15)

&lt;223&gt; N: a, c, t or g

&lt;220&gt;

## 五、發明說明 (72)

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (18)

&lt;223&gt; N: a, c, t or g

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (21)

&lt;223&gt; Y: t or c

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (24)

&lt;223&gt; Y: t or c

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (27)

&lt;223&gt; N: a, c, t or g

&lt;400&gt; 7

gtcggatccg crtngcnac ytcytcngg

29

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 623

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pichia finlandica

&lt;400&gt; 8

```
gctctatcag gaatcggcctt aagcgtcgcg aaaaagttcc ttcagctcgg cgccaaagta 60
acgatctctg atgtcagtgg agagaaaaaa tatcacgaga ctgttggtgc tctgaaagcc 120
caaaatctca aactgacaa cctccattat gtacaggcag attccagcaa agaagaagat 180
aacaagaaat tgatttcgga aactctggca acctttgggg gcctggatat tgtttggtgct 240
aatgcaggaa ttggaaagt cgtcccacc catgaaacac ccttcgacgt atggaagaag 300
gtgattgctg tgaatttgaa tggagtattc ttactggata agctagccat caattactgg 360
ctagagaaaa gcaaaccggg cgtaattgtc aacatgggat cagtccactc tttttagtagca 420
gctcctggcc ttgcgatta tggagctgca aaaggcgggtg tcaaactgtt aacacaaaca 480
ttggctctag agtacgcata tcatggtatt agagtaaatt ctgtcaatcc ggggtacatt 540
tcgactcctt tgatagatga ggttccgaaa gagcgggttg ataaacttgt aagcttgcac 600
cctattggga gactaggtcg tcc 623
```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

## 五、發明說明 (73)

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(9)

<223> BamHI site

<400> 9

gtcggatcct cagagatcgt tactttggc

29

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(9)

<223> BamHI site

<400> 10

gtcggatccc gactcctttg atagatgag

29

<210> 11

<211> 599

<212> DNA

<213> Pichia finlandica

<400> 11

tgggctgaac ctggctgtgc tactgggcag agcaaaatca gatagaagag cttgtgtttt 60  
 tgtagcacc cttctttttt ttgaaattct ctacagctca attacctgtt cacattcaat 120  
 acagagtact atcttttcga ttcttatca gataagcaat tgacaatatt agtagcacct 180  
 gatgcacttt tcgagaacac acctgagtac aaaacaatat atatcattat attagaacag 240  
 tgacattgag aacaattttc cagcatataa tgtaattagg tgcacaaaca accaggaaaa 300  
 acacctgatt aaaaaatccg gatattaaga atcatgaaac aaaattcaat gttaccctac 360  
 ccattccttc tcggaacctc ctgatgactt attaatagtg aggttggttc gataaaaatc 420  
 gcgaatttct ccattccata aatttcctta taacttggtt tactatacac acacactatt 480  
 atcgatatgt cttataactt ccataacaag gttgcagttg ttactggagc tctatcagga 540  
 atcggcttaa gcgtcgcaaa aaagttcctt cagctcgcg ccaagtaac gatctctga 599

## 五、發明說明 (74)

<210> 12  
<211> 581  
<212> DNA  
<213> *Pichia finlandica*

<400> 12  
cgactccttt gatagatgag gttccgaaag agcgggttga taaacttga agcttgcacc 60  
ctattgggag actaggtcgt ccagaggaag ttgctgatgc agtcgcattt ctgtgttccc 120  
aggaggccac ttcatcaac ggcgtttctt tgccgggtga cggggggtac acagcccagt 180  
aaattggaca ctttttgctc ttattatct tcccgcggt tcaccaatta tccggtgtac 240  
gtagggttga gtgactttct ggtttctgca cttgaatgaa actctctttt accccacaaa 300  
atcagctcag taaattatct tgttatata taaataagac agaaaccctg tggactccta 360  
gtatgggtgt ctactttcat taaggcagtc acaaaagcaa tggcgaaatc aactgatgga 420  
aagatagtta cactggagga gcaggcctac aatggccac ccgcacggat cataggagaa 480  
gctatcgcca ttaaagcgaa gctggctgcc aatcggacac tcccagttaa gtttgaaaga 540  
aagcgtggtc ttcaaccacc accagggatg tctagacaag a 581

<210> 13  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 13  
tcgacatgtc ttataatttc cataacaag 29

<210> 14  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14  
gcagaattcc tctagattac tgggctgtgt accc 34

<210> 15  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

## 五、發明說明 (75)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 15

cacgaattct aaaatgtctt ataattcca taacaag

37

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 16

agtactagta ttactgggct gtgtaccc

28

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 17

agaccatgga tccaatgtat ccagatttaa aaggaa

36

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 18

gaatctagat taaccgcggc ctgcctg

27

## 五、發明說明 (76)

<210> 19  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 19  
ctttctagag gaattcaacc atggcaaaag ttctgtgtgt tc 42

<210> 20  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

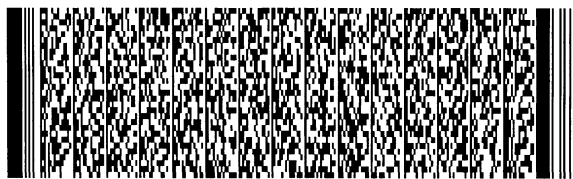
<400> 20  
cagtctagat tagaccgctt tttgaattt ggcg 34

四、中文發明摘要 (發明之名稱：(R)-2-辛醇脫氫酵素，該酵素之製造方法，編碼該酵素之DNA及利用此DNA之醇類的製造方法)

本發明是提供作為以 $\text{NAD}^+$ ( $\text{NADH}$ )作為輔酶之氧化反應觸媒的(R)-2-辛醇脫氫酵素及其編碼基因。本發明的酵素是從比齊酵母菌屬(*Pichia*)、念珠菌屬(*Candida*)及歐加鐵屬(*Ogataea*)微生物等可以得到的酵素。採用此(R)-2-辛醇脫氫酵素進行酮類的還原，以醇類，特別是(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯及(R)-丙氧基苯衍生物為始，可以進行醇類的生產。此外，本發明的(R)-2-辛醇脫氫酵素具有優良的活性及立體選擇性。

英文發明摘要 (發明之名稱：(R)-2-OCTANOL DEHYDROGENASES, METHODS FOR PRODUCING THE ENZYMES, DNA ENCODING THE ENZYMES, AND METHODS FOR PRODUCING ALCOHOLS USING THE ENZYMES)

This invention provides (R)-2-octanol dehydrogenase that catalyzes oxidation-reduction reaction using  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH}$ ) as a coenzyme and the genes that encodes them. The enzymes of this invention can be obtained from microorganisms such as the genera *Pichia*, *Candida*, and *Ogataea*, and so on. It is possible to produce alcohols, in particular, alcohols such as (S)-4-halo-3-hydroxybutyric acid esters and (R)-propoxybenzene derivatives by reducing ketones with this (R)-2-octanol



四、中文發明摘要 (發明之名稱：(R)-2-辛醇脫氫酵素，該酵素之製造方法，編碼該酵素之DNA及利用此DNA之醇類的製造方法)

英文發明摘要 (發明之名稱：(R)-2-OCTANOL DEHYDROGENASES, METHODS FOR PRODUCING THE ENZYMES, DNA ENCODING THE ENZYMES, AND METHODS FOR PRODUCING ALCOHOLS USING THE ENZYMES)

dehydrogenase. Moreover, the (R)-2-octanol dehydrogenase of this invention is excellent in activity and stereoselectivity.



## 六、申請專利範圍

1. 一種(R)-2-辛醇脫氫酵素，具有以下所示的物理化學性質(1)至(4)：

## (1) 作用

i) 以氧化型  $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸作為輔酶，將醇氧化生成酮；

ii) 以還原型  $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸作為輔酶，將酮還原生成醇；

## (2) 基質特異性

i) 使含有2-辛醇之兩個光學異構體中的(R)-2-辛醇優先氧化；

ii) 使4-鹵化乙醯乙酸酯還原而生成(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯。

## (3) 最適pH

氧化反應的最適pH為8.0~11.0，還原反應的最適pH為5.0~6.5；

## (4) 基質特異性

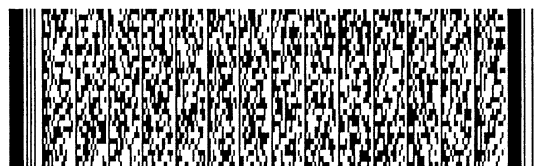
i) 對於2級醇而言，具有比1級醇還高的酵素活性；

ii) 對於(R)-2-辛醇而言，具有比2-丙醇明顯較高的酵素活性。

2. 如申請專利範圍第1項所述之(R)-2-辛醇脫氫酵素，其為來自比齊酵母菌屬、念珠菌屬及歐加鐵(Ogataea)屬中選擇出之任何種微生物。

3. 如申請專利範圍第2項所述之(R)-2-辛醇脫氫酵素，屬於比齊酵母菌屬者為Pichia finlandica。

4. 如申請專利範圍第2項所述之(R)-2-辛醇脫氫酵



## 六、申請專利範圍

素，屬於比齊酵母菌屬者為Pichia jadinii。

5. 如申請專利範圍第2項所述之(R)-2-辛醇脫氫酵素，屬於念珠菌屬者為Candida utilis。

6. 如申請專利範圍第2項所述之(R)-2-辛醇脫氫酵素，屬於歐加鐵(Ogataea)屬者為歐加鐵菌(Ogataea wickerhamii)。

7. 一種申請專利範圍第1項所述之(R)-2-辛醇脫氫酵素的製造方法，為含有其由來為比齊酵母菌屬、念珠菌屬及歐加鐵(Ogataea)屬中選擇出之任何種微生物，由培養這些微生物產生申請專利範圍第1項所述之酵素的工程。

8. 一種編碼多核苷酸，具有下述(a)至(c)任何一項述之(R)-2-辛醇脫氫酵素活性的蛋白質之編碼：

(a) 含有序列編號：1之鹽基序列的多核苷酸；

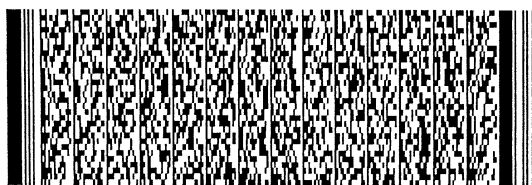
(b) 編碼由序列編號：2之胺基酸序列組成之蛋白質的多核苷酸；

(c) 與由序列編號：1之鹽基序列所組成的多核苷酸在嚴苛條件下(清洗：42℃、含有0.5×SSC的初級清洗緩衝液)雜交的多核苷酸。

9. 一種如申請專利範圍第8項所述之多核苷酸編碼的蛋白質。

10. 一種插入如申請專利範圍第8項所記載之多核苷酸的重組載體。

11. 如申請專利範圍第10項所記載之重組載體，插入了更進一步以 $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸作為輔酶，而具有作為進行氧化還原反應觸媒的脫氫酵素能力的編碼多



## 六、申請專利範圍

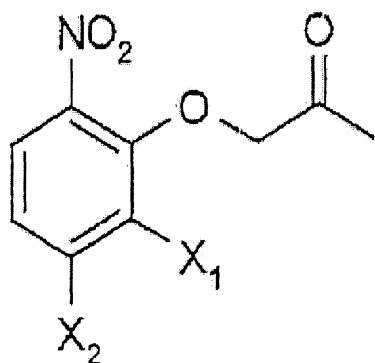
核苷酸。

12. 一種轉形體，其可表現如申請專利範圍第8項所述之多核苷酸，或申請專利範圍第10項所述之載體。

13. 一種如申請專利範圍第9項所述之蛋白質製造方法，含有培養如申請專利範圍第12項所記載之轉形體的工程。

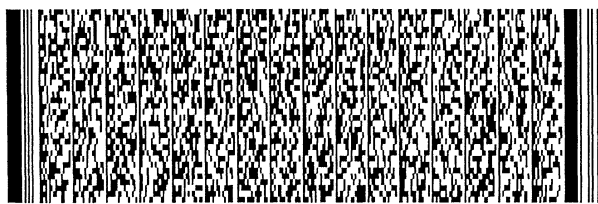
14. 一種醇類的製造方法，其特徵為如申請專利範圍第1項所述之(R)-2-辛醇脫氫酵素，如申請專利範圍第9項所述之蛋白質，產生該酵素及蛋白質的微生物，或者是該微生物的處理物，作用於酮類，使該酮類還原而製造出醇類，其中該酮類為4-鹵化乙醯乙酸酯衍生物，而該醇類為(S)-4-鹵化-3-氫氧基酪酸酯衍生物，且該酮類為如一般式1所示之丙酮基氧基苯衍生物

一般式1

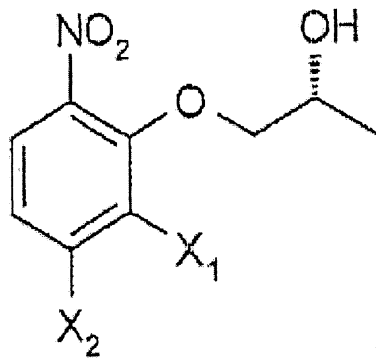


(式中， $X_1$  及  $X_2$  分別代表鹵素原子之意)，該醇類為如一般式2所示之(R)-丙氧基苯衍生物；

一般式2



## 六、申請專利範圍



15. 如申請專利範圍第14項所述之醇類製造方法，具有前述微生物為如申請專利範圍第12項所述之轉形體。

16. 如申請專利範圍第14項所述之醇類製造方法，其4-鹵化乙醯乙酸酯衍生物為4-氯乙醯乙酸乙酯，其醇類為(S)-4-氯-3-氫氧基酪酸乙酯。

17. 如申請專利範圍第14項所述之醇類製造方法，前述丙酮基氧基苯衍生物為2-丙酮基氧基-3, 4-二氟硝基苯(2-acetonyloxy-3, 4-difluoronitrobenzene)，其醇類為2, 3-二氟-6-硝基[[ (R)-2-氫氧基丙基]氧基]苯。

18. 如申請專利範圍第14項所述之醇類製造方法，其特徵為含有更進一步附加氧化型 $\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸進行還原型的變換工程。

